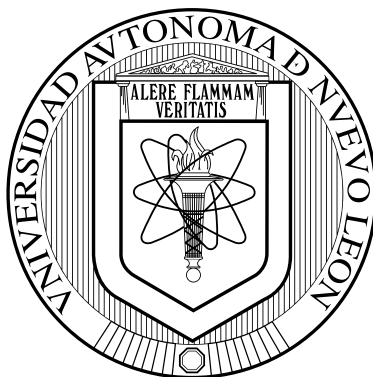


UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE ODONTOLOGÍA



EVALUACIÓN *IN VITRO* DE ANTISÉPTICOS DE ORIGEN NATURAL
CONTRA *STREPTOCOCCUS MUTANS* Y *STREPTOCOCCUS SOBRINUS*

por

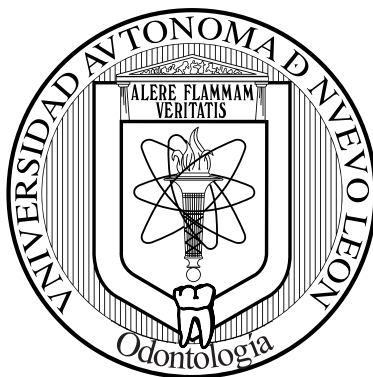
C. D. YUVISELA PERALES MARTÍNEZ

Como requisito parcial para obtener el grado de MAESTRÍA
EN CIENCIAS ODONTOLÓGICAS EN EL ÁREA DE
ODONTOPEDIATRÍA

Noviembre de 2019

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE ODONTOLOGÍA



EVALUACIÓN *IN VITRO* DE ANTISÉPTICOS DE ORIGEN NATURAL
CONTRA *STREPTOCOCCUS MUTANS* Y *STREPTOCOCCUS SOBRINUS*

por

C. D. YUVISELA PERALES MARTÍNEZ

Como requisito parcial para obtener el grado de MAESTRÍA
EN CIENCIAS ODONTOLÓGICAS EN EL ÁREA DE
ODONTOPEDIATRÍA

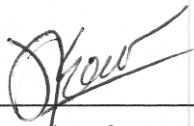
Noviembre de 2019

Maestría en Ciencias Odontológicas en el Área de Odontopediatría

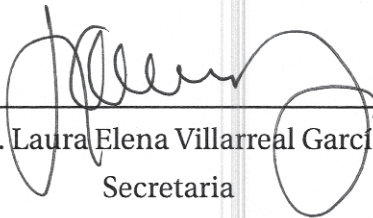
EVALUACIÓN *IN VITRO* DE ANTISÉPTICOS DE ORIGEN NATURAL CONTRA
STREPTOCOCCUS MUTANS Y *STREPTOCOCCUS SOBRINUS*

C. D. YUVISELA PERALES MARTÍNEZ

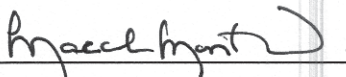
Comité de Tesis



Dra. María Argelia Akemi Nakagoshi Cepeda
Presidenta



Dra. Laura Elena Villarreal García
Secretaria



Dra. Marcela Montes Villarreal
Vocal

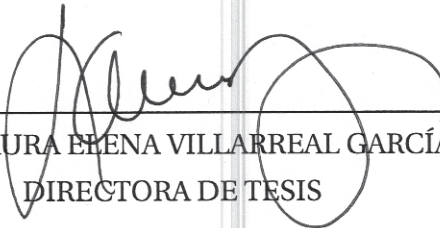
Maestría en Ciencias Odontológicas en el Área de Odontopediatría

EVALUACIÓN *IN VITRO* DE ANTISÉPTICOS DE ORIGEN NATURAL CONTRA
STREPTOCOCCUS MUTANS Y *STREPTOCOCCUS SOBRINUS*



C. D. YUVISELA PERALES MARTÍNEZ
TESISTA

Comité de Tesis



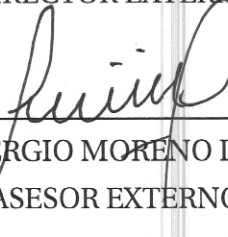
DRA. LAURA ELENA VILLARREAL GARCÍA
DIRECTORA DE TESIS



DRA. SONIA MARTHA LÓPEZ VILLARREAL
CODIRECTORA DE TESIS



DR. DAVID GILBERTO GARCÍA HERNÁNDEZ
DIRECTOR EXTERNO



DR. SERGIO MORENO LIMÓN
ASESOR EXTERNO

A Manuel A. Andrade

El mejor

AGRADECIMIENTOS

Quiero expresar un sincero agradecimiento, en primer lugar, a Dios, por ser mi guía y acompañarme en el transcurso de mi vida, brindándome la luz que ha guiado mi camino y la sabiduría para terminar con éxito mis metas propuestas.

A mi esposo, Manuel, ya que con su apoyo encontré una mejor manera de alcanzar mis metas, y a través de su amor, consejos, paciencia y a su gran apoyo metodológico, hoy estamos terminando esta tesis.

Gracias a mis padres, por los valores y principios que me inculcaron. Gracias por ser el ejemplo de esfuerzo y valentía de no temer a las adversidades, pero principalmente por ser los promotores para alcanzar mis sueños y por confiar y creer en mis expectativas.

A mi hermano, por estar siempre presente, acompañándome y por brindarme el apoyo que he necesitado a lo largo de mi vida. Siempre será mi mejor y más grande ejemplo a seguir.

Agradezco a la Dra. Laura Villarreal García, asesora de mi tesis y la principal colaboradora durante todo este proceso, quien con su dirección, conocimientos, enseñanzas y paciencia me permitió el desarrollo de este trabajo. Así como a la Dra. Sonia López Villarreal y al Dr. Gustavo Martínez González por formar parte del comité de tesis, por enriquecerme en conocimiento y por sus valiosas sugerencias e interés en la revisión del presente trabajo.

Asimismo, agradezco a la Dra. Myriam de la Garza Ramos por tener siempre las

puertas abiertas de la Unidad de Odontología Integral en el Centro de Investigación y Desarrollo en Ciencias de la Salud; a la Facultad de Biología de la UANL, por permitirme el uso de su equipo y su invaluable ayuda en el desarrollo de este estudio; así como al Dr. David Gilberto García Hernández y al Dr. Sergio Moreno Limón, personal docente de dicha facultad, por todo su tiempo, paciencia y sus conocimientos aportados a este trabajo.

Quiero agradecer a Dany y Yalile; Mandy y Mely; Mónica, Vale, Ale, Maca y Sergio, y a todos mis compañeros del posgrado por haber recorrido conmigo este camino y enseñarme que ser familia no significa tener los mismo apellidos, familia significa “nadie se queda atrás”.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, por el apoyo económico para la realización de mis estudios.

Y finalmente, a todas aquellas personas que contribuyeron de una forma u otra en la realización de este trabajo.

RESUMEN

Introducción: El *Rosmarinus officinalis* y el *Thymus vulgaris* son especies de plantas perennes de la familia Lamiaceae. Sus hojas se han utilizado desde la antigüedad con fines aromáticos y culinarios. Ambas plantas han demostrado tener efectos antimicrobianos, antioxidantes y antiinflamatorios. **Objetivo:** Determinar el efecto inhibitorio de los extractos de *Thymus vulgaris* y *Rosmarinus officinalis* contra el *Streptococcus mutans* y el *Streptococcus sobrinus*. **Metodología:** Se realizó la identificación de las plantas de las especies *Rosmarinus officinalis* y *Thymus vulgaris* y se procedió a realizar los extractos. Se activaron las cepas de referencia y se realizaron pruebas fitoquímicas, de sensibilidad de disco, concentración mínima inhibitoria, prueba de letalidad con *Artemia salina*, y pruebas estadísticas. **Resultados** Para las pruebas fitoquímicas, ambos extractos dieron positivo al grupo carboxilo, carbonilo, taninos y sesquiterpenlactonas. Además, el *Thymus vulgaris* dió positivo a triterpenos, carbohidratos, alcaloides y flavonoides. Para las pruebas microbianas, el *Rosmarinus officinalis*, a concentración de 1000 µg/ml, mostró halos de inhibición mayores para *S. sobrinus* (halo promedio de 7.8 mm). El *Thymus vulgaris* mostró su mayor actividad a concentración de 500 µg/ml (halo de inhibición promedio de 7.3 mm). El *Rosmarinus officinalis* mostró una concentración mínima inhibitoria de 100 µg/ml, contra ambas cepas. Para el *Thymus vulgaris*, la concentración mínima inhibitoria contra ambas cepas fue de 150 µg/ml. Para la prueba de toxicidad, ambos extractos resultaron moderadamente tóxicos: LC₅₀ de 230.43 µg/ml para el *Rosmarinus officinalis*, y 455.56 µg/ml para el *Thymus vulgaris*. **Conclusiones** Los extractos de las plantas probadas podrían servir como componentes antibacterianos y antibióticos naturales; se podrían agregar en algunas formulaciones dentales (pastas dentales o enjuagues bucales) para disminuir los principales causantes de la caries dental.

ABSTRACT

Introduction: *Rosmarinus officinalis* and *Thymus vulgaris* are species of perennial plants from the Lamiaceae family. Their leaves have been used for aromatic and culinary purposes, since ancient times. Both plants have demonstrated antimicrobial, antioxidant and anti-inflammatory properties. **Objective:** To determine the inhibitory effect of *Thymus vulgaris* and *Rosmarinus officinalis* extracts against *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sobrinus*. **Methodology:** After the identification of *Rosmarinus officinalis* and *Thymus vulgaris* plants species, their leaves were dried to make aqueous extracts. The reference strains were activated. Phytochemical, disc sensitivity, minimum inhibitory concentration, lethality on *Artemia salina*, and statistical test were performed. **Results:** For phytochemical tests, both extracts tested positive for the carboxyl, carbonyl, tannins and sesquiterpenlactones group. In addition, *Thymus vulgaris* tested positive for triterpenes, carbohydrates, alkaloids and flavonoids. For microbial test, *Rosmarinus officinalis*, at concentrations of 1000 µg/ml, showed greater inhibition halos for *S. sobrinus*, with average halo diameter of 7.8 mm. *Thymus vulgaris* showed its highest activity at concentrations of 500 µg/ml, with an average halo diameter of 7.3 mm. The minimum inhibitory concentration for *Rosmarinus officinalis* against both bacterial strains was 100 µg/ml. For *Thymus vulgaris*, the minimum inhibitory concentration against both bacterial strains was 150 µg/ml. For the toxicity test, both extracts were moderately toxic: LC₅₀ of 230.43 µg/ml for *Rosmarinus officinalis*, and 455.56 µg/ml for *Thymus vulgaris*. **Conclusion:** The extracts of the plants under study could serve as natural antibacterial and antibiotic components. They could be added in some dental formulations, such as toothpastes or mouthwashes, to reduce the main causes of tooth decay.

TABLA DE CONTENIDO

Sección	Página
1. Introducción	1
2. Hipótesis	3
2.1. Hipótesis Nula	3
2.2. Hipótesis de Estudio	3
3. Objetivos	4
3.1. Objetivo General	4
3.2. Objetivos Específicos	4
4. Antecedentes	5
4.1. Caries Temprana de la Infancia	5
4.2. Factores de Riesgo de la Caries	7
4.3. Ingredientes Activos y Eficacia Antimicrobiana de Colutorios de Venta Comercial	10
4.4. Plantas Tradicionales con Efecto Antimicrobiano	11
4.4.1. <i>Rosmarinus officinalis</i>	11
4.4.2. <i>Thymus vulgaris</i>	12
4.5. Preparación de Extractos	12
4.5.1. Extracción por Maceración	13
4.6. Identificación de Metabolitos Secundarios	13
4.7. Prueba de Letalidad con <i>Artemia salina</i>	16
5. Métodos	18
5.1. Selección y Procesamiento de las Plantas de Estudio	18
5.2. Obtención de Extractos	20
5.3. Pruebas Fitoquímicas	22
5.3.1. Grupo Carboxilo	23
5.3.2. Grupo Carbonilo	23

5.3.3. Oxhidrilos Fenólicos (Taninos)	23
5.3.4. Esteroles y Triterpenos	23
5.3.5. Carbohidratos	24
5.3.6. Sesquiterpenlactonas	24
5.3.7. Alcaloides	24
5.3.8. Flavonoides	24
5.4. Prueba de Sensibilidad en Disco	26
5.5. Determinación de Concentración Mínima Inhibitoria	31
5.6. Ensayo de Letalidad en <i>Artemia salina</i>	33
5.7. Análisis de componentes principales	36
5.7.1. Escalamiento de los vectores característicos	38
5.7.2. T^2 como medida de variabilidad	39
6. Resultados	41
6.1. Obtención de los Extractos Vegetales de Estudio	41
6.2. Pruebas Fitoquímicas	41
6.3. Actividad Antibacteriana	45
6.4. Concentración Mínima Inhibitoria	47
6.5. Pruebas de Toxicidad	48
7. Discusión	50
8. Conclusiones	54
8.1. Recomendaciones y Trabajos Futuros	55
Literatura Citada	56

LISTA DE FIGURAS

Figura	Página
1. Espécimen de <i>Thymus vulgaris</i>	18
2. Certificado de herborización y depósito	19
3. Hojas secas de las plantas de estudio	20
4. Pesaje de las hojas secas	20
5. Plantas de estudio en etanol	21
6. Incubadora oscilatoria	21
7. Evaporación del etanol mediante calor indirecto	22
8. Soluciones madre de cada extracto	26
9. Muestra de 20 mg de extracto de <i>Thymus vulgaris</i> pesada en báscula analítica	27
10. Cuatro diferentes concentraciones de cada extracto	27
11. Cultivos de <i>S. mutans</i> y de <i>S. sobrinus</i>	28
12. Muestra de 100 µl de inóculo de cepa bacteriana	28
13. Sembrado bacteriano con técnica de estría	29
14. Ensayo de Kirby-Bauer de difusión en placa por discos de los extractos	30
15. Grupos de control para pruebas de sensibilidad en disco	30
16. Cajas de Petri en incubadora a 37 °C	31
17. Placa de 96 pozos para MIC, sin reactivo MTT	32
18. Placa de 96 pozos para MIC, con reactivo MTT	32
19. Preparación de agua de mar sintética	33
20. Cámara de eclosión con quistes de <i>A. salina</i>	34
21. Microplaca de 96 pozos con nauplios de <i>A. salina</i> , extracto y sal de mar	35
22. Nauplios de <i>A. salina</i> vistos a través de estereoscopio	35
23. Controles negativos para pruebas fitoquímicas	42
24. Prueba fitoquímica para grupo carboxilo	42
25. Prueba fitoquímica para grupo carbonilo	43
26. Prueba fitoquímica para taninos	43
27. Prueba fitoquímica para sesquiterpenlactonas	43
28. Prueba fitoquímica triterpenos y esteroides	44
29. Prueba fitoquímica para flavonoides	44

30. Prueba fitoquímica para carbohidratos	44
31. Prueba fitoquímica para alcaloides	45
32. Actividad inhibitoria de <i>Rosmarinus officinalis</i> y <i>Thymus vulgaris</i>	45
33. Puntuaciones de las observaciones de la actividad antimicrobiana (halos de inhibición) de los extractos contra <i>S. mutans</i> y <i>S. sobrinus</i>	46
34. Absorbancia de los extracto a 655 nm	48
35. Regresión probit de la letalidad contra <i>Artemia salina</i> de los extractos	49

LISTA DE TABLAS

Tabla	Página
I. Porcentaje de niños de 2 a 5 años con caries temprana de la infancia por grupo de edad	6
II. Resultados de las pruebas fitoquímicas a las plantas de estudio	41
III. Valores propios de las matrices de covarianzas de la actividad antimicrobiana (halos de inhibición) de los extractos contra <i>S. mutans</i> y <i>S. sobrinus</i>	47
IV. Valores promedio de LC ₅₀ para los extractos de <i>Rosmarinus officinalis</i> y <i>Thymus vulgaris</i>	49

NOMENCLATURA

µg	Microgramo
µl	Microlitro
LC ₅₀	Concentración letal 50 %
DO	Densidad óptica
g	Gramo
hr	Hora
l	Litro
MIC	Concentración mínima inhibitoria
min	Minuto
mg	Miligramo
ml	Mililitro

1. INTRODUCCIÓN

La caries es una enfermedad que afecta a millones de personas en el mundo sin importar sexo, edad, raza o estado socioeconómico. Según la Organización Mundial de la Salud (OMS), la caries dental es la condición más prevalente que se incluyó en el estudio de la Carga Mundial de la Enfermedad en 2015 (World Health Organization, 2017), posicionándose en primer lugar la caries en dientes permanentes (2.3 billones de personas), y en doceavo lugar la caries en dientes temporales (560 millones de niños) (GBD 2015 Disease and Injury Incidence and Prevalence Collaborators, 2016).

A través del tiempo, se ha tratado de combatir esta enfermedad implementando medidas de prevención y restauración, pero hasta el día de hoy no se ha encontrado el recurso que nos exima de esta enfermedad. Se ha observado que, con medidas preventivas, se reduce la gravedad y extensión de dicha afección, más no se elimina a los agentes causantes. Algunos de estos agentes son el *Streptococcus mutans* y el *Streptococcus sobrinus*, bacterias que viven en la flora bacteriana de la cavidad bucal. Estas bacterias, al entrar en contacto con los hidratos de carbono fermentables presentes en los alimentos, inician la producción de ácido que, al quedar en contacto con las superficies dentales, genera un proceso de desmineralización. Este proceso se inicia con una mancha blanca, y puede llegar a formar grandes cavidades en la estructura dental (Mosaddad *et al.*, 2019).

Dentro de los antisépticos estudiados, la clorhexidina ha demostrado tener la mayor eficacia clínica. Sin embargo, presenta algunas desventajas: produce manchas y pigmentaciones oscuras en los dientes, lengua y restauraciones; cambia el sabor de los alimentos; produce irritación en la mucosa bucal y su costo supera en promedio el doble del valor de los enjuagues que contienen aceites esenciales (Kulkarni *et al.*, 2017).

La importancia en el área médica y odontológica de productos naturales se vuelve relevante hoy en día. La elaboración de ensayos microbiológicos que compruebe la actividad antimicrobiana de extractos naturales para la inhibición de *S. mutans* y *S. sobrinus* contribuye como una medida coadyuvante a la prevención de futuras enfermedades, como caries en niños.

La OMS apoya a los medicamentos tradicionales y alternativos, cuando estos han demostrado beneficios para el paciente y riesgos mínimos. Por esto, el uso de plantas medicinales puede ser de gran aplicación en la atención primaria de los sistemas de salud (Yin *et al.*, 1991).

En México, existen pocos estudios que utilizan antimicrobianos naturales con aplicación potencial en odontología, menos aún en odontopediatría. Por lo tanto, la relevancia de esta investigación radica en que para obtener la validación inhibitoria del *Rosmarinus officinalis* y del *Thymus vulgaris* frente al *S. mutans* y al *S. sobrinus* se han elaborado extractos donde se puede observar la verdadera actividad antimicrobiana de estas especies vegetales. Con este propósito, esta investigación tiene por objeto manejar soluciones de *Rosmarinus officinalis* y *Thymus vulgaris*. Se estudiarán los metabolitos secundarios presentes en las plantas de estudio para después evaluar su actividad antibacteriana aplicando la técnica microbiológica de difusión en placa por discos. Posteriormente, se determinará la concentración mínima inhibitoria contra las bacterias a estudiar: *S. mutans* y *S. sobrinus*. Finalmente, se hará una valoración para considerar su uso seguro en individuos.

2. HIPÓTESIS

Los extractos acuosos de *Thymus vulgaris* y de *Rosmarinus officinalis* producen inhibición para el *Streptococcus mutans* y el *Streptococcus sobrinus*.

2.1 Hipótesis Nula

El diámetro del halo de inhibición producido por los extractos acuosos de *Thymus vulgaris* y de *Rosmarinus officinalis* para el *Streptococcus mutans* y el *Streptococcus sobrinus* será igual al producido por el control negativo.

2.2 Hipótesis de Estudio

El diámetro del halo de inhibición producido por los extractos acuosos de *Thymus vulgaris* y de *Rosmarinus officinalis* para el *Streptococcus mutans* y el *Streptococcus sobrinus* será mayor al producido por el control negativo.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo General

Determinar el efecto inhibitorio de los extractos de *Thymus vulgaris* y *Rosmarinus officinalis* contra el *Streptococcus mutans* y el *Streptococcus sobrinus*.

3.2 Objetivos Específicos

- Elaborar extractos etanólicos de las especies vegetales de interés, mediante maceración.
- Determinar la presencia de grupos químicos en los extractos vegetales obtenidos, mediante pruebas fitoquímicas.
- Identificar halos de inhibición mediante la técnica de sensibilidad en disco de los extractos de *Thymus vulgaris* y de *Rosmarinus officinalis*.
- Obtener la concentración mínima inhibitoria de los extractos de estudio contra las bacterias *S. mutans* y *S. sobrinus*.
- Evaluar la toxicidad de los extractos vegetales de mayor actividad de inhibición bacteriana frente a *Artemia salina*.

4. ANTECEDENTES

4.1 Caries Temprana de la Infancia

La caries dental es una enfermedad infecciosa y transmisible, resultado de la falta de balance entre múltiples factores de riesgo y factores protectores a través del tiempo.

La caries temprana de la infancia (CTI) se define como la presencia de uno o más dientes cariados (cavitados o no), ausentes (debido a caries), o restaurados, en la dentición primaria, en niños de edad preescolar, es decir, entre el nacimiento y los 71 meses de edad (Alonso Noriega y Karakowsky, 2009; SIVEPAB, 2017).

La CTI es un problema de salud mundial significativo que afecta a millones de niños en edad preescolar en todo el mundo. En general, el 20 % de los niños preescolares con una familia cuyo ingreso es de los más bajos sufrieron alrededor del 80 % de CTI. La mayoría de las encuestas, si no todas, indicaron que la gran mayoría de la CTI no fue tratada (Duangthip *et al.*, 2017). En el último reporte presentado por el Sistema de Vigilancia Epidemiológica de Patologías Bucles (SIVEPAB), en 2017, en México un promedio de 73.3 % de los niños entre 2 y 5 años de edad presentan CTI, como se muestra en la Tabla I (SIVEPAB, 2017).

La caries temprana en los dientes temporales causa muchas dificultades, incluyendo problemas de masticación, habla, dolor, problemas psicológicos y efectos negativos en el crecimiento, el peso y la calidad de vida del niño, tanto dentro de la familia como en la sociedad. La CTI se puede prevenir con intervenciones educativas apropiadas y promoción de la salud (Peltzer y Mongkolchat, 2015). Según un estudio realizado por Manchanda *et al.* (2014), en la Universidad de Oxford, proporcionar a las madres educación en salud

TABLA I

Porcentaje de niños de 2 a 5 años con caries temprana de la infancia por grupo de edad (SIVEPAB, 2017)

Edad	N	Número de niños con CTI	Porcentaje
2	1090	541	49.6
3	2265	1530	67.5
4	3775	2906	77.0
5	4919	3854	78.3
Total	12049	8831	73.3

oral condujo a una reducción de la caries dental en los niños por lo tanto proporcionar orientación anticipada y educación a los padres es esencial para la promoción de la salud oral óptima de sus hijos (Mangla *et al.*, 2017).

Teniendo en cuenta el posible impacto negativo en la salud oral general y en la calidad de vida relacionada con la salud oral de niños de 2 a 5 años y sus padres (Martins-Júnior *et al.*, 2013), la CTI representa un indicador de programas de prevención omitidos, ya sea en países desarrollados o en desarrollo. La evidencia clínica ha demostrado de manera sucinta la relación entre el desarrollo de la caries en la primera infancia y los comportamientos incorrectos. El hábito de quedarse dormido con una botella de bebidas endulzadas o con un chupete endulzado, madres y/o compañeros de juego con caries dental sin tratar, y el intercambio de alimentos y utensilios (transmisión horizontal) exponen a los bebés a un mayor riesgo de CTI si diariamente las prácticas de higiene bucal caseras son insuficientes (Hallas *et al.*, 2015). La razón principal de esta situación se debe principalmente a que los padres o cuidadores no están conscientes de la posible infección. De ello, se desprende que las intervenciones diseñadas para evaluar su conocimiento y, en consecuencia, cambiar sus prácticas, que se sabe están asociadas con la CTI, pueden ser útiles en la prevención de la caries a una edad temprana.

4.2 Factores de Riesgo de la Caries

La Academia Americana de Odontología Pediátrica (AAPD) proporciona modelos para evaluar el riesgo de caries. Los factores considerados por estos modelos incluyen la dieta (uso frecuente de alimentos azucarados, chupete con endulzante o uso de biberón nocturno); un huésped susceptible (pacientes con inmunosupresión, uso de medicamentos, como jarabes azucarados, o tratamientos que producen xerostomía); la exposición al flúor en alimentos o pastas dentales y la microflora a la que se exponga al paciente (AAPD Council on Clinical Affairs, 2014).

La adquisición temprana de *Streptococcus mutans* es un evento clave para el inicio de la enfermedad (Parisotto *et al.*, 2010). El principal reservorio de *S. mutans* es la madre, de quien el niño la adquiere durante un período de ventana alrededor de los 2 años (Kozai *et al.*, 1999). La caries dental es una enfermedad prevenible y, por lo tanto, debería ser mejor si la prevención de la CTI comienza en los períodos prenatal y perinatal (incluido el embarazo y los primeros meses después del nacimiento) y aborda la salud tanto de la madre como del bebé. En una encuesta realizada por Vozza *et al.* (2017), se descubrió que el 53.1 % de los encuestados nunca cepillaron los dientes de sus niños en los primeros 3 años de vida y el 74.7 % nunca les administró fluoruro (antes o después de la erupción dental) a sus hijos. Por lo tanto, se concluye que hay falta de conocimiento y conciencia sobre la información, la educación y la promoción de la salud oral en todos los padres encuestados, y esto puede potencialmente aumentar el estado de riesgo de salud oral de sus hijos.

De acuerdo a lo anterior, los proyectos de prevención de la salud oral deben organizarse para que mejoren en:

1. Alimentación y hábitos alimenticios del bebé. La AAPD resalta que los bebés no deben dormir con biberones que contengan líquidos que no sean agua; se de-

be evitar el consumo prolongado de bebidas azucaradas; no se debe sumergir el chupete en miel o soluciones endulzadas; se debe reducir el uso de biberones desde los 14 meses en adelante, controlando la dieta del niño en la cantidad y frecuencia de exposición a azúcares; se debe restringir la ingesta de azúcar durante las comidas principales, ya que el flujo salival aumenta (American Academy on Pediatric Dentistry y American Academy of Pediatrics, 2009).

2. Cuidado de la salud bucal y la nutrición de los padres para limitar la transmisibilidad de las bacterias cariogénicas, específicamente manteniendo una buena higiene oral y realizando visitas dentales regulares. En el caso de caries no tratadas, limitando los hábitos de intercambio salival, como limpiar el chupete con agua en lugar de saliva, no soplar y/o saborear la comida del niño durante la ablactación y no compartir los mismos cubiertos.
3. Higiene oral del bebé. Siguiendo las normas internacionales y nacionales de salud oral: desde el nacimiento hasta la primera erupción dental, las encías del bebé se limpian dos veces al día con una gasa húmeda o guantes especiales; después de la erupción del primer diente primario, cepillarse los dientes después de las comidas (o después de tomar medicamentos que contengan sacarosa), con un dentífrico con bajo contenido de fluoruro (500 ppm) para minimizar el riesgo de ingestión accidental; uso de suplementos de flúor individuales para niños con riesgo medio/alto de caries dental).

Las barreras para poner en práctica la recomendación de cepillarse los dientes, especialmente para padres con acceso limitado a cuidado dental pediátrico, incluyen la incertidumbre de los padres sobre cuándo iniciar el cepillado, el costo de los cepillos de dientes y la resistencia de los niños al cepillado (Huebner y Riedy, 2010). Las normas de la Administración de Drogas y Alimentos (FDA) de EE. UU. con respecto al etiquetado de pasta de dientes y comercialización del consumidor se han sumado a la confusión sobre qué tipo de pasta de dientes usar para niños pequeños, y cuánto y cuándo comenzar a

usar pasta dental fluorada (Milgrom *et al.*, 2009).

La concentración de flúor en la pasta de dientes varía de un país a otro de acuerdo con las regulaciones gubernamentales, lo que hace que los estudios sean difíciles de comparar. La FDA permite dentífricos que contienen de 850 a 1150 ppm de flúor total para niños de dos años en adelante y 1500 ppm de flúor a partir de los seis años. Sin embargo, los consumidores y proveedores de servicios de salud a menudo no entienden la distinción.

Un panel de expertos convocado por el gobierno de los EE. UU. recomendó el uso de un “frotis” de pasta dental habitual con fluoruro (generalmente alrededor de 1100 ppm) para niños menores de dos años (MCHB Expert Panel, 2007). La intención detrás de la elección del término “frotis” fue limitar el exceso de exposición al flúor. Sin embargo, sin evidencia de los beneficios y riesgos, la recomendación tendrá poco impacto, particularmente mientras que la FDA limita las instrucciones de uso a adultos y niños de 2 años en adelante.

Instruir a los padres a usar un “frotis” de pasta de dientes con flúor no es universalmente efectivo para reducir la cantidad aplicada al cepillo de dientes. Además, es posible que se aplique muy poca pasta de dientes. Rana *et al.* (2007) concluyeron que la reducción de la cantidad de pasta dental con flúor a menos del tamaño de un chicharo para minimizar el riesgo de fluorosis debe tomarse con precaución, ya que puede comprometer los efectos cariostáticos de la pasta de dientes, como se muestra en estudios *in vitro*.

Se han realizado numerosos ensayos clínicos para evaluar la capacidad de los agentes que no contienen flúor para mejorar o complementar el efecto remineralizante de los fluoruros, pero hasta ahora su efecto y seguridad no están claros. Hay dos revisiones sistemáticas previas que evaluaron la eficacia de un solo producto para prevenir la caries

dental en niños y adultos (Walsh *et al.*, 2015; Riley *et al.*, 2015).

El xilitol es un alcohol de azúcar que tiene las propiedades de reducir los niveles de *S. mutans* en la placa y la saliva. En 1975, en Finlandia se desarrolló la primera goma de mascar con el objetivo de reducir la caries y mejorar la salud oral (American Academy on Pediatric Dentistry y American Academy of Pediatrics, 2009). Desde entonces, se han introducido y vendido varios productos sin receta y se han aplicado profesionalmente en todo el mundo, pero se observó que el vehículo o modo efectivo de administrar xilitol era en forma de goma de mascar, aunque otras formas podrían ser igualmente buenas. Sin embargo, se observa que una ingesta elevada de sacarosa a los 3 años aumenta el riesgo de aumento del recuento de *S. mutans* y con una tasa de caries aumentada de 3 a 16 años.

Los autores de estas revisiones solo encontraron pruebas de baja calidad que sugieren que el xilitol puede ser efectivo para prevenir la caries en los dientes permanentes de los niños, sin embargo, se encontró que los estudios incluidos en el metaanálisis tenían un riesgo de sesgo poco claro (Walsh *et al.*, 2015; Riley *et al.*, 2015).

4.3 Ingredientes Activos y Eficacia Antimicrobiana de Colutorios de Venta Comercial

Los enjuagues bucales previenen el crecimiento de la placa dentobacteriana y ayudan a mejorar la salud oral inhibiendo la tasa de proliferación de bacterias en la placa o evitan la unión de las bacterias a las superficies dentales. En los últimos 100 años, se ha reconocido que los compuestos fenólicos por ejemplo, del Listerine, son germicidas y eficaces para reducir la placa y las enfermedades de las encías (Alshehri, 2018). Uno de los enjuagues bucales que se encuentra de venta en el mercado estadounidense es el Corsodyl, cuyo ingrediente activo principal es el digluconato de clorhexidina al 0.2 %, mientras que el Listerine, que lo podemos encontrar simple y con fluoruro, exhibe como componentes principales el timol (aceite esencial de tomillo) en 0.06 %, eucaliptol (aceite

de eucalipto) al 0.09 %, salicilato de metilo al 0.06 %, mentol al 0.04 %, etanol al 26.7 %, ácido benzoico al 0.15 % y agua. El Listerine, que agrega fluoruro de sodio, lo hace al 0.0221 % y elimina el etanol (Zheng y Wang, 2011).

En un estudio realizado por Braga *et al.* (2018), se evalúan cinco diferentes enjuagues bucales y su efecto sobre *S. mutans*, los enjugues que fueron evaluados son el PerioGard (Colgate), que contiene gluconato de clorhexidina al 0.12 %; Listerine (digluconato de clorhexidina al 0.2 %); Noplak (clorhexidina al 0.12 % y cetilpiridino); Malvatricin (tirotricina al 0.1 mg/ml y sulfato de hidroquinolina 1 mg/ml) y Cepacol (cloruro de cetilpiridinio). En este estudio, se encontró que los valores más bajos de MIC se observaron para el Cepacol, mientras que los valores más altos se encontraron para Listerine. En otro estudio realizado por Kocak *et al.* (2009), se demostró que el diclorhidrato de octenidina al 0.1 % mostró mayor efectividad contra *S. mutans*, comparándolo con la clorhexidina al 0.12 % (Listerine) y los enjuagues enzimáticos microbianos (Biotene).

4.4 Plantas Tradicionales con Efecto Antimicrobiano

A través de los años, se han usado productos naturales en la prevención de la caries dental, es decir que tienen el objetivo de controlar al *Streptococcus mutans* y al *Streptococcus sobrinus*. El uso de las plantas es debido a que se ha demostrado que presentan en su composición propiedades antimicrobianas y son usadas a manera de extractos, los cuales se obtienen a partir de diferentes procedimientos y solventes (Sasidharan *et al.*, 2010).

4.4.1 *Rosmarinus officinalis*

El *Rosmarinus officinalis* es una especie de planta perenne leñosa, originaria de la región mediterránea. Actualmente, se puede encontrar y cultivar en todos los continentes como planta aromática y ornamental. Sus hojas comúnmente son usadas como condi-

mento y sirven para fines medicinales. Los componentes principales del aceite esencial que le dan sus actividades farmacológicas son el 1,8-cineol (52.2 %), el alcanfor (15.2 %) y el α -pineno (12.4 %).

En estudios realizado por Jardak *et al.* (2017); García *et al.* (2012) se demostró que el aceite de *Rosmarinus officinalis* podría tener un papel importante contra bacterias formadoras de biopelícula.

4.4.2 *Thymus vulgaris*

El *Thymus vulgaris* es una especie de planta de hoja perenne nativa del sur de Europa y el Mediterráneo. Es otra de las plantas tradicionales que se ha utilizado desde la antigüedad como ingrediente culinario, para agregar sabor a quesos, licores y carnes. Los componentes principales del aceite esencial comercial son timol (23–60 %), terpineno (18–50 %), *p*-cimeno (8–44 %), carvacrol (2–8 %) y linalool (3–4 %).

En estudios recientes, se ha observado que el *Thymus vulgaris* inhibe las bacterias plantónicas y la biopelícula. Por lo que puede aplicarse como agente antimicrobiano contra bacterias patógenas, en especial a las formadoras de biopelícula (Hassanshahian y Mohsenipour, 2015).

4.5 Preparación de Extractos

A nivel popular, basta muchas veces con extraer los principios activos de raíces, hojas, flores, tallos, de acuerdo a los antecedentes encontrados, de la manera más sencilla, como puede ser por medio de una infusión o decocción. En cambio, para analizar las propiedades medicinales de una droga vegetal, en muchos casos se recurrirá a métodos de extracción más complejos, que permitan obtener métodos reproducibles, con cuantificación de principios activos en lo posible. Los métodos extractivos más empleados son

maceración en frío o en calor, lixiviación, soxhlet y arrastre por vapor de agua (Verde-Star *et al.*, 2016).

4.5.1 Extracción por Maceración

Este es un método de extracción sólido-líquido donde el material vegetal que se pretende extraer contiene compuestos solubles en el líquido de extracción. Para realizar este proceso, el material vegetal se corta en pequeños trozos o se muele. Fresco o seco se coloca en recipientes adecuados, añadiendo el solvente seleccionado por polaridad: hexano (o éter de petróleo), cloroformo, y metanol o etanol, en reposo o en un equipo con agitación continua, a temperatura ambiente. Otra opción es obtenerlo en una forma directa agregando una mezcla de solventes: metanol, cloroformo y hexano, en la proporción 7 : 2 : 1, obteniendo un extracto en forma directa (Wijesekera, 2017).

4.6 Identificación de Metabolitos Secundarios

Las pruebas fitoquímicas se realizan por medio de un ensayo biodirotado, para determinar cualitativamente los principales grupos químicos presentes en la planta, a partir del cual puede orientarse el fraccionamiento de los extractos.

Los extractos puros se someten a diferentes pruebas para elucidar su estructura (Schroeder y Gronquist, 2006), a partir de los siguientes métodos:

- Métodos físicos
 - Punto de fusión
 - Rotación óptica
 - Difracción de rayos X
- Métodos espectroscópicos
 - Ultravioleta

- Resonancia magnética nuclear
- Infrarrojo
- Espectrómetro de masas
- Métodos químicos
 - Pruebas coloridas

En el desarrollo de este trabajo, se utilizaron pruebas coloridas, mediante las cuales se pueden identificar los siguientes grupos.

CARBOXILO Los ácidos carboxílicos son compuestos orgánicos usados en procesos químicos e industriales, que naturalmente provienen de grasas, aceites vegetales, lácteos, frutos cítricos. Los extractos estudiados se presentan como ácidos, lo que les da un olor desagradable. La industria alimentaria los aplica como aditivos, conservantes (ácido sórbico y benzoico), reguladores de alcalinidad, agentes antimicrobianos, acidulantes en bebidas carbonatadas.

Ayudante a la maduración del queso suizo (ácido propiónico), elaboración de col fermentada y bebidas suaves (ácido láctico). El sector farmacéutico los emplea en la fabricación de medicamentos: antipiréticos y analgésicos (ácido acetilsalicílico), antimicóticos (ácido benzoico), vitamina C (ácido ascórbico), fungicidas (ácido caprílico) y laxantes (ácido hidroxibutanodioico).

CARBONILO La acumulación de macromoléculas dañadas, incluidas las proteínas dañadas oxidativamente (carboniladas), es un sello distintivo del envejecimiento celular.

OXHIDRILOS FENÓLICOS (TANINOS) Su composición química es variable pero poseen una característica común, la de ser astringentes y coagular los alcaloides, albúminas y metales pesados. Presentan acción hemostática, antiséptica y tonificante. Tienen la propiedad de coagular las albúminas de las mucosas y de los tejidos creando una capa

seca, aislante y protectora que reduce la irritación y el dolor sobre la piel.

TRITERPENOS Los triterpenos son compuestos que se encuentran en la mayoría de los organismos, siendo un grupo abundante dentro del reino vegetal. Son un tipo de lípidos no saponificables que se forman por unión de varias unidades de isopreno, concretamente 6. En general se relaciona la actividad anticancerosa con el contenido en triterpenos, a la cual podemos añadir propiedades inmunomoduladoras, antiinflamatorias, hipoglucemiantes, hipolipemiantes y hepatoprotectoras.

CARBOHIDRATOS Término aplicado a un grupo de sustancias que incluyen los azúcares, almidones y celulosa, junto con muchas otras sustancias relacionadas. Este grupo de compuestos juega un papel de vital importancia en las plantas y animales, tanto como elementos estructurales como para el mantenimiento de la actividad funcional. Los carbohidratos son los principales componentes de las plantas que contienen energía y representan entre el 60 y el 90 % del peso de la materia seca de estas. Esta clase de nutrientes comprende los elementos carbono, hidrógeno y oxígeno. Un esquema de clasificación estructural separa los carbohidratos en monosacáridos, disacáridos o polisacáridos.

SESQUITERPENLACTONAS Se sabe que exhiben efectos antiinflamatorios, principalmente por inhibición del factor de transcripción NF-B.

Presentan actividades biológicas como respuesta antiinflamatoria (principalmente por inhibición del factor de transcripción NF- κ B), antitumoral, citotóxica, antibacterial, antimalaria y actividad neurotóxica y alérgica.

ALCALOIDES Tienen efectos analgésicos, anestésicos, curativos y psicotrópicos. Los alcaloides actúan sobre el SNC y tienen un gran poder adictivo y excitante. La mayoría de plantas medicinales, tóxicas y alucinógenas deben sus efectos a la actividad biológica de los alcaloides.

FLAVONOIDES Tienen propiedades antioxidantes, antiinflamatorias, antivirales y anti-alérgicos, y presentan un papel protector frente a enfermedades cardiovasculares, cáncer y diversas patologías.

ESTEROLES La mayoría de los estudios en animales y humanos muestran que los fitosteroles reducen el colesterol total en suero o plasma y los niveles de colesterol de lipoproteínas de baja densidad. Se ha reportado la acción antipirética en conejos del 24-etilcolesta-7, 22-dien-3 β -ol (asterosterol). En el caso de esteroides con el núcleo D5, 7 - 3-hidroxiandrostadieno (ergosterol), estos son convertidos en vitamina D.

4.7 Prueba de Letalidad con *Artemia salina*

Este ensayo se utilizó inicialmente para la preevaluación de extractos vegetales con compuestos antitumorales y se determinó una correlación positiva entre la mortalidad de las larvas de *Artemia salina* y la citotoxicidad frente a las células 9KB (carcinoma nasofaríngeo humano) (Gunatilaka y Kingston, 1997).

La *Artemia salina* es un crustáceo diminuto de cuerpo blando, comúnmente comercializado como quistes en tiendas de mascotas como alimento para peces. Por lo tanto, ofrece ventajas tales como: disponibilidad, bajo costo, facilidad de almacenamiento, los ensayos pueden realizarse prácticamente en cualquier momento y los requerimientos para este ensayo son mínimos.

El fundamento de este ensayo se basa en la habilidad de un extracto o compuesto de ser tóxico para la *A. salina* cultivada en laboratorio (Carballo *et al.*, 2002). Se utiliza para

la evaluación preliminar de la toxicidad (Solis *et al.*, 1993), detección de toxinas fúngicas (Szabo *et al.*, 2017), toxicidad de extractos de plantas (Arican, 2009), metales pesados (Martínez *et al.*, 1999), toxinas de cianobacterias (Jaki *et al.*, 1999), pesticidas (Barahona y Sánchez-Fortún, 1999), y en el ensayo de toxicidad de materiales dentales (Pelka *et al.*, 2000).

5. MÉTODOS

El presente estudio se llevó a cabo en la Unidad de Odontología Integral del Centro de Investigación y Desarrollo en Ciencias de la Salud, y en el Laboratorio de Química Analítica de la Facultad de Biología, de la Universidad Autónoma de Nuevo León.

Se obtuvieron extractos hidroalcohólicos de *Rosmarinus officinalis* y de *Thymus vulgaris*, al igual que se realizaron los cultivos de las cepas de *Streptococcus mutans* y de *Streptococcus sobrinus*.


5.1 Selección y Procesamiento de las Plantas de Estudio

Para obtener los extractos, se recolectaron de su hábitat natural, en la localidad de Real de Catorce, San Luis Potosí, plantas de cada especie: *Rosmarinus officinalis* (ver Figura 1(a)) y *Thymus vulgaris* (ver Figura 1(b)).




Figura 1. Espécimen de *Thymus vulgaris*.

Dos ejemplares de cada especie fueron llevados al Herbario UNL de la Facultad de Biología de la UANL, para su catalogación y depósito; registrándose en la colección del herbario, el *Thymus vulgaris* con el folio 028234, y el *Rosmarinus officinalis* con el folio 028235 (ver Figura 2).



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE BOTÁNICA
HERBARIO UNL

A QUIEN CORRESPONDA:

Por este conducto me permito informar que el **DR. SERGIO MORENO LIMÓN** entregó al Herbario UNL 2 ejemplares de plantas herborizadas utilizadas en su investigación para su resguardo en este herbario institucional. Estas están siendo utilizadas para desarrollar la siguiente Tesis de Maestría: Evaluación in vitro de antisépticos de origen natural contra *Streptococcus mutans*. Anexo a la presente los Números de Folio correspondientes registrados en la Colección.


MATERIAL DONADO:

Folio	Género	Especie	Familia
028234	<i>Thymus</i>	<i>vulgaris</i> L.	Lamiaceae
028235	<i>Rosmarinus</i>	<i>officinalis</i> L.	Lamiaceae

Sin otro particular, se extiende la presente para los fines legales que al interesado convengan.

ATENTAMENTE

Cd. Universitaria, a 08 de Marzo de 2018



Dr. Marco Antonio Guzmán Lucio
Jefe y Curador del Herbario

Ccpa.

Pedro de Alba y Manuel Barragán s/n
Cd. Universitaria, San Nicolás de los Garza, N. L.
Apartado Postal F-2 y F-38, C.P. 66455
Tel. y Fax 8329-4110 ext. 6456

Figura 2. Certificado de herborización y depósito.

5.2 Obtención de Extractos

Cada espécimen se colocó a secar en un horno de calor a 60 °C durante 5 horas. Una vez que estuvieron completamente secas, se procedió a deshojar cada una de las plantas para separarlas de las estructuras que no se utilizaron para la realización del extracto, como se muestra en la Figura 3.

Para el proceso de extracción, se pesaron 64.27 g de hojas secas de *Thymus vulgaris* (ver Figura 4(a)) y dos porciones de hoja secas de *Rosmarinus officinalis*, cada porción con 50 g, (ver Figura 4(b)).



Figura 3. Hojas secas de las plantas de estudio: (a) *Rosmarinus officinalis* y (b) *Thymus vulgaris*.



Figura 4. Pesaje de las hojas secas: (a) *Rosmarinus officinalis* y (b) *Thymus vulgaris*.

Se colocó cada lote en un matraz con 1000 ml de etanol al 96 %, como se muestra en la Figura 5, para quedarse durante 3 semanas en la incubadora orbital INO-650 M con movimientos oscilatorios (ver Figura 6).

A continuación, los extractos se filtraron con papel Whatman #5, para posteriormente ponerse a evaporar el solvente mediante calor indirecto a 80 °C (Thermo Scientific



Figura 5. Plantas de estudio en etanol.



Figura 6. Incubadora oscilatoria.

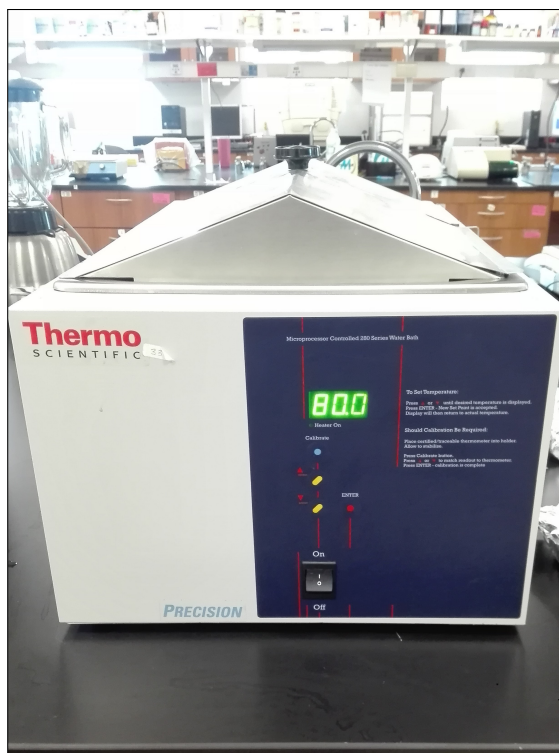


Figura 7. Evaporación del etanol mediante calor indirecto.

Water Bath 280), en sesiones de 4 horas durante 2 meses (ver Figura 7), para finalmente colocarlos en un horno de calor seco a 60 °C, por 18 horas.

Una vez obtenido el extracto, se calcula el rendimiento obtenido. El cálculo del rendimiento es obtenido a partir del material seco utilizado y la diferencia del peso del extracto. Se determina el porcentaje correspondiente.

5.3 Pruebas Fitoquímicas

Las pruebas fitoquímicas permiten, mediante la combinación con diferentes sustancias, inferir la presencia de ciertos grupos químicos en un extracto vegetal. A continuación se mencionan las pruebas químicas realizadas en el presente estudio.

5.3.1 Grupo Carboxilo

Prueba de bicarbonato de sodio (NaHCO_3). Se agregan unas gotas de solución de bicarbonato de sodio al 10 % en agua a la muestra (1–2 mg) disuelta en 1 ml de agua o etanol. La prueba es positiva si se observa el desprendimiento de burbujas de anhídrido carbónico.

5.3.2 Grupo Carbonilo

Prueba de la 2,4–dinitrofenilhidrazina (100 mg de 2,4–DFNH + 10 ml de ETOH + 3 ml de HCl aforar a 100 ml con agua destilada) y se añaden unas gotas de este reactivo a la muestra disuelta en etanol, la formación de un precipitado amarillo, rojo o naranja indica la presencia de un grupo carbonilo.

5.3.3 Oxhidrilos Fenólicos (Taninos)

Prueba de cloruro férrico. Se disuelve la muestra (1–2 mg) en 1 ml de etanol, añadiendo unas gotas de cloruro férrico al 5 % en etanol; la coloración verde oscura o negra es prueba positiva.

5.3.4 Esteroles y Triterpenos

Prueba de Liebermann-Burchard. El reactivo se prepara mezclando 1 ml de anhídrido acético más 1 ml de cloroformo y 3 gotas de ácido sulfúrico concentrado. Una gota del reactivo se le añade a la muestra (1–2 mg) disuelta en 1 ml de cloroformo o sin disolver. La aparición de un color azul o morado es prueba positiva para esteroides y color rojizo para triterpenos, en el lapso de unas horas, particularmente los insaturados.

5.3.5 Carbohidratos

Prueba de la antrona. En un tubo de ensaye se colocan 1–2 mg de la muestra disuelta en agua, después se deja resbalar por las paredes del tubo una solución reciente de antrona al 0.2 % en ácido sulfúrico concentrado; la prueba es positiva si en la interfaz aparece un anillo azul-verdoso o violeta.

5.3.6 Sesquiterpenlactonas

Prueba de Baljet. Se utilizan 2 soluciones que se mezclan en volúmenes iguales antes de usarse. La solución A se prepara pesando 1 g de ácido pícrico y disolviéndolo en 100 ml de etanol. Para la solución B, se pesan 10 g de hidróxido de sodio, disolviéndolos en 100 ml de agua. Para la prueba, se ponen 3 a 4 mg de compuesto de prueba, añadiendo 3 a 4 gotas del reactivo, siendo positiva si se forma coloración anaranjada o roja oscura.

5.3.7 Alcaloides

Reactivo de Mayer. Se disuelven 1.36 g de HgCl_2 en 60 ml de agua y 5 g de KI en 10 ml de agua. Se juntan las dos soluciones y sé afora a 100 ml. El reactivo solo debe añadirse a soluciones previamente aciduladas con HCl o H_2SO_4 diluidos. La solución no debe contener ácido acético o etanol, porque disuelven el precipitado. Sólo deben agregarse unas cuantas gotas de reactivo porque algunos alcaloides son solubles en exceso de reactivo.

5.3.8 Flavonoides

Prueba de Shinoda. Se disuelven 1–2 mg de la muestra en 1 ml de etanol, agregando unas gotas de HClO_3 concentrado y una o dos limaduras de Mg. Si la solución se torna de color rojo intenso, la prueba es positiva. Otros colores (naranja, verde o azul), pueden

estar presentes flavonas, flavononas, flavonoles, flavononoles o xantonas.

Cuando no hay interferencia de pigmentos no flavonoides, el material vegetal se puede ensayar directamente. Por ejemplo, si los pétalos blancos de una flor se ponen amarillos en presencia de vapores de amoníaco, deben contener flavonas y/o flavonoles. Las chalconas y las auronas viran de amarillo a rojo. Los pétalos que contienen antocianinas viran a rojo intenso en presencia de amoníaco.

El SbCl_5 en CCl_4 produce colores característicos con los flavonoides (prueba de Marini-Bettolo). Las chalconas forman precipitados rojo oscuro o violeta y las flavonas, precipitados amarillo o naranja.

Las flavonas y flavonoles se disuelven en H_2SO_4 concentrado y originan soluciones fuertemente amarillas. Las flavanonas dan colores anaranjados o guinda a rojo azulado.

Los flavonoides-3,4 (leucoantocianidinas) y catequinas se han localizado al hervir el material vegetal con HCl 2*N*. Las primeras dan un color rojo y las últimas, un color café-amarillento. La presencia de las antocianidinas formadas se confirma extraíéndolas con $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_4\text{OH}$, y se pueden identificar por cromatografía en papel.

Los flavonoides con dos hidroxilos orto o para entre sí, forman espejo de plata cuando se mezclan 5–10 mg en solución etanólica (1–2 ml) con tres gotas de AgNO_3 al 12 % en agua. Si después de agitar 15 min no se forma el espejo, se puede calentar 1 min y observar.

5.4 Prueba de Sensibilidad en Disco

Una vez obtenidos los extractos, se preparan las soluciones madres (ver Figura 8) colocando 20 mg de extracto (ver Figura 9), 500 μl de CH_3SOCH_3 y 9500 μl de agua estéril destilada. A partir de dicha preparación, se obtuvieron cuatro diferentes concentraciones: 1000, 500, 250 y 125 $\mu\text{g/ml}$ de cada una de las plantas de estudio (ver Figura 10).

Para la activación de las cepas se utilizó una incubadora Thermo Scientific INC-UIE-01, donde se colocó el *S. mutans* y el *S. sobrinus* en medio de cultivo Müller Hinton a 37 °C por 16 horas. Se tomó una colonia de cada cepa y se incubó a la misma temperatura por 3 horas. Se tomaron 100 μl de la colonia y se incubaron en 5 ml del mismo agar por 1 hora más (ver Figura 11).

En una cabina de bioseguridad, Logic, se realizó el sembrado de las bacterias, colocando 100 μl (ver Figura 12) y distribuyéndose por medio de la técnica de estría en la

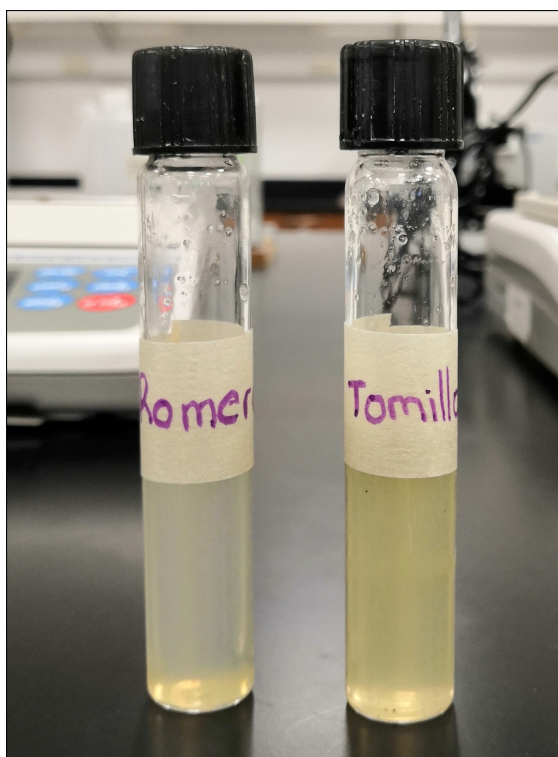


Figura 8. Soluciones madre de cada extracto.

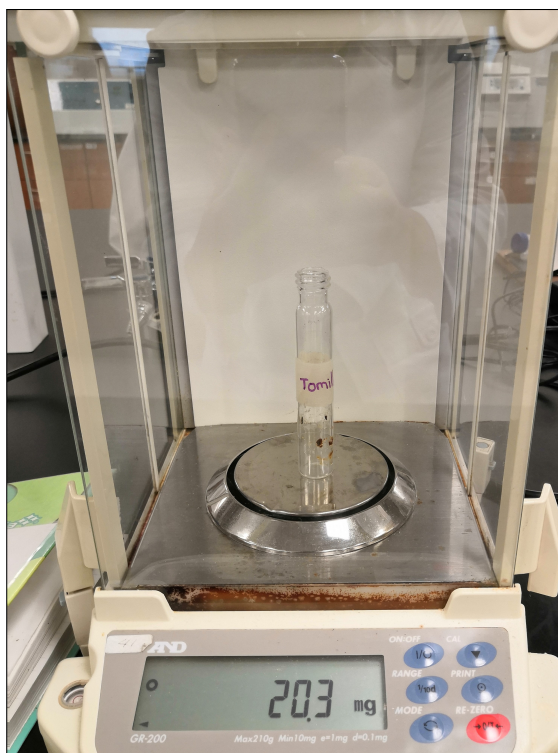


Figura 9. Muestra de 20 mg de extracto de *Thymus vulgaris* pesada en báscula analítica.

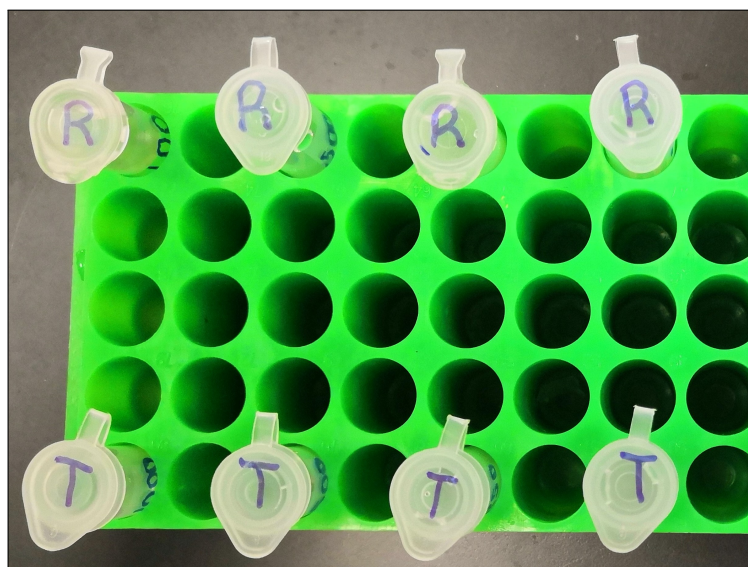


Figura 10. Cuatro diferentes concentraciones de cada extracto.

caja Petri, como se muestra en la Figura 13.

Se ejecutó el ensayo de Kirby-Bauer de difusión en placa por discos (Bauer *et al.*,



Figura 11. Cultivos de *S. mutans* y de *S. sobrinus*.

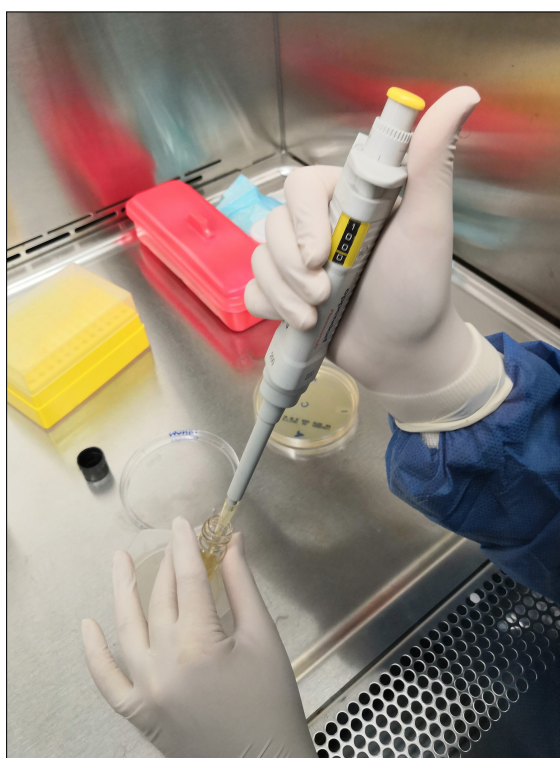


Figura 12. Muestra de 100 μ l de inóculo de cepa bacteriana.

1966), embebiendo los sensidiscos con 20 μ l de los extractos de *Rosmarinus officinalis* y de *Thymus vulgaris* en cuatro concentraciones: 1000, 500, 250 y 125 μ g/ml (por triplicado), como se muestra en la Figura 14. Además, se colocó un sensidisco para el control positivo,



Figura 13. Sembrado bacteriano con técnica de estría.

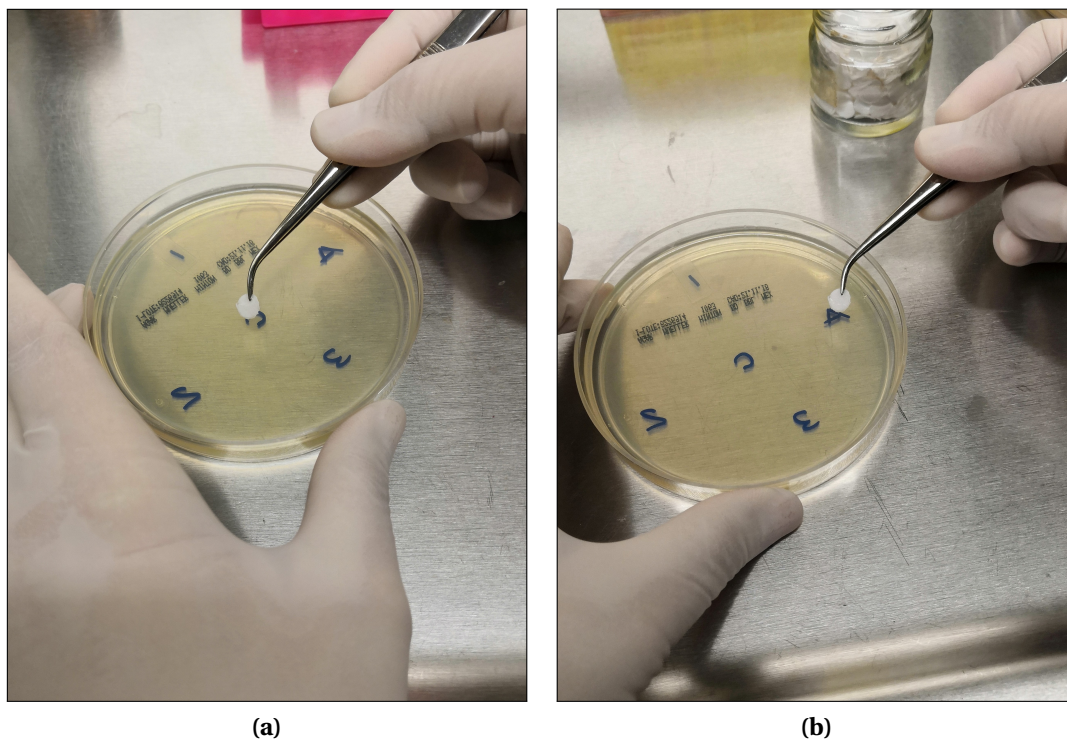
donde se usó clorhexidina al 0.12 % (ver Figura 15(a)), y uno más para el control negativo, con agua bidestilada (ver Figura 15(b)).

Después, con una pinza estéril se colocaron los discos de papel sobre la superficie del agar Müller-Hinton. Se colocaron tres discos de papel con el extracto en cada caja Petri, con un total de 24 repeticiones de cada una, mas los controles. Se dejó reposar por 10 minutos para que los extractos se difundieran, y se colocaron las 16 cajas de Petri en la incubadora a 37 °C por 48 horas como se muestra en la Figura 16.

Se evaluó el efecto antimicrobiano por la medición de halos de inhibición, según Carroll *et al.* (2019). Considerándose como inhibición leve la presencia de un halo de 6 mm; inhibición moderada, un halo de 8 mm; y alta, un halo de más de 8 mm.



Figura 14. Ensayo de Kirby-Bauer de difusión en placa por discos de los extractos.



(a)

(b)

Figura 15. Grupos de control para pruebas de sensibilidad en disco: (a) clorhexidina al 0.12 % y (b) agua bidestilada estéril.



Figura 16. Cajas de Petri en incubadora a 37 °C.

5.5 Determinación de Concentración Mínima Inhibitoria

Para determinar la concentración mínima inhibitoria (MIC), se toman en cuenta los extractos en los que se haya observado mayor actividad antimicrobiana en la prueba de difusión en placa por discos.

Para llevar a cabo la prueba, se utiliza la técnica de microdilución en placa de 96 pozos (Andrews, 2001). Las concentraciones que se evaluaron para el *Rosmarinus officinalis* fueron de 100, 150, 200, 250 y 300 µg/ml, y para el *Thymus vulgaris* fueron de 150, 300, 450, 600 y 750 µg/ml. Se incluyeron muestras blanco con medio de cultivo Mueller-Hinton, inóculo y medio con control positivo (clorhexidina al 0.12 %). El ensayo se realizó por triplicado, distribuyendo la placa de 96 pozos de la siguiente manera: de la A a la C para *S. mutans*, de la D a la F para *S. sobrinus* (ver Figura 17). En la cámara de anaerobiosis, se depositó el inóculo ajustado a la escala 0.5 de McFarland (1.5×10^8 unidades formadoras de colonia/ml).

Una vez que se colocó el reactivo MTT (3-(4, 5-dimetiltiazol-2)-2, 5-bromuro de difeniltetrazolio), las placas de 96 pozos se incubaron a 37 °C por un periodo de 24 h (ver

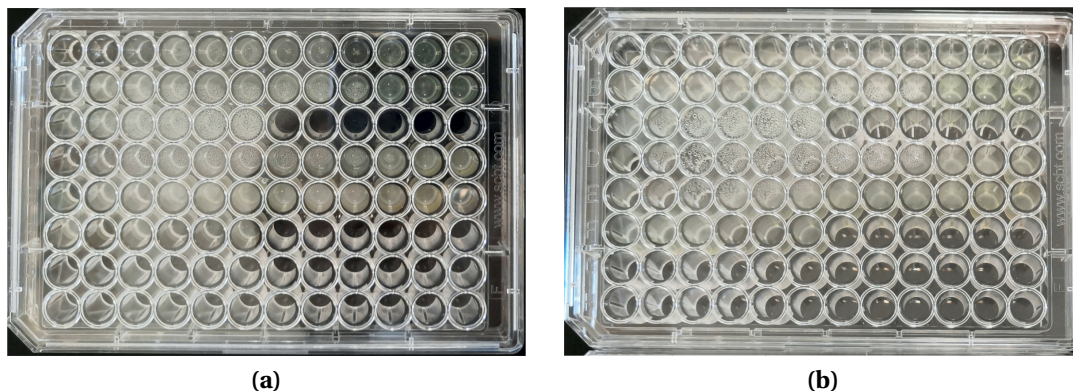


Figura 17. Placa de 96 pozos para MIC, sin reactivo MTT: (a) *Rosmarinus officinalis* y (b) *Thymus vulgaris*.

Figura 18).

Después de este tiempo, los tubos se analizaron considerando la absorbancia (densidad óptica, DO, a 655 nm) mediante el uso de un espectrofotómetro. La menor absorbancia entre las concentraciones probadas, después de restar la turbidez misma del extracto por su concentración evaluada, se considera la MIC.

El porcentaje de viabilidad se obtiene como

$$\% \text{ viabilidad} = \frac{\text{DO células tratadas}}{\text{DO células control}} \times 100. \quad (1)$$

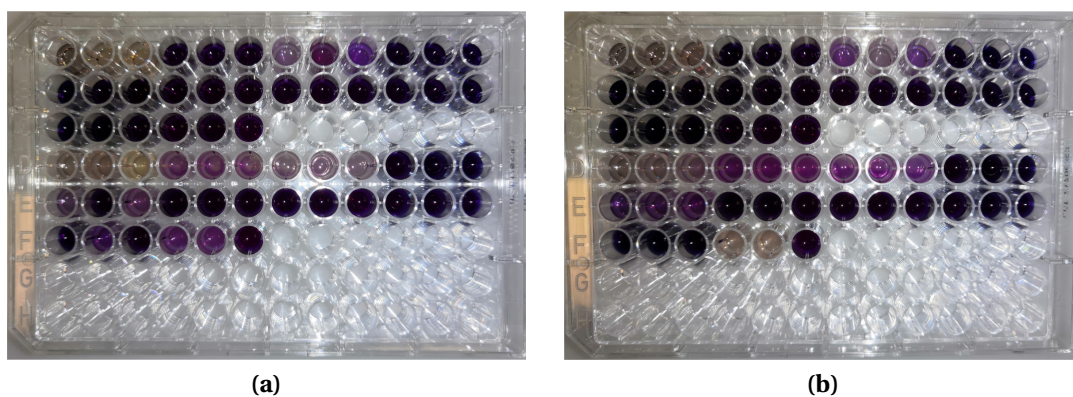


Figura 18. Placa de 96 pozos para MIC, con reactivo MTT: (a) *Rosmarinus officinalis* y (b) *Thymus vulgaris*.

El DO de las células de control debe dar una lectura mayor o igual a 1.

5.6 Ensayo de Letalidad en *Artemia salina*

Se atemperan unas horas los quistes de *A. salina* y se pesan 0.1 g. Se depositan en 300 ml agua de mar sintética (40 g de sal de mar (ver Figura 19(a)), 6 mg de levadura de cerveza, ajustar a pH 7.8 (ver Figura 19(b)), aforar a 1 l) en una cámara de eclosión, con un lado oscuro y otro iluminado (bombilla eléctrica de 20 W), dividida con un pequeño orificio, se mantiene por 24 hr con aeración constante a 22–29 °C.

Las artemias eclosionadas se separan y mantienen a las mismas condiciones por 48 hr, como se muestra en la Figura 20.

Se colocan en una microplaca de 96 pozos con 100 µl de agua de mar en cada pozo

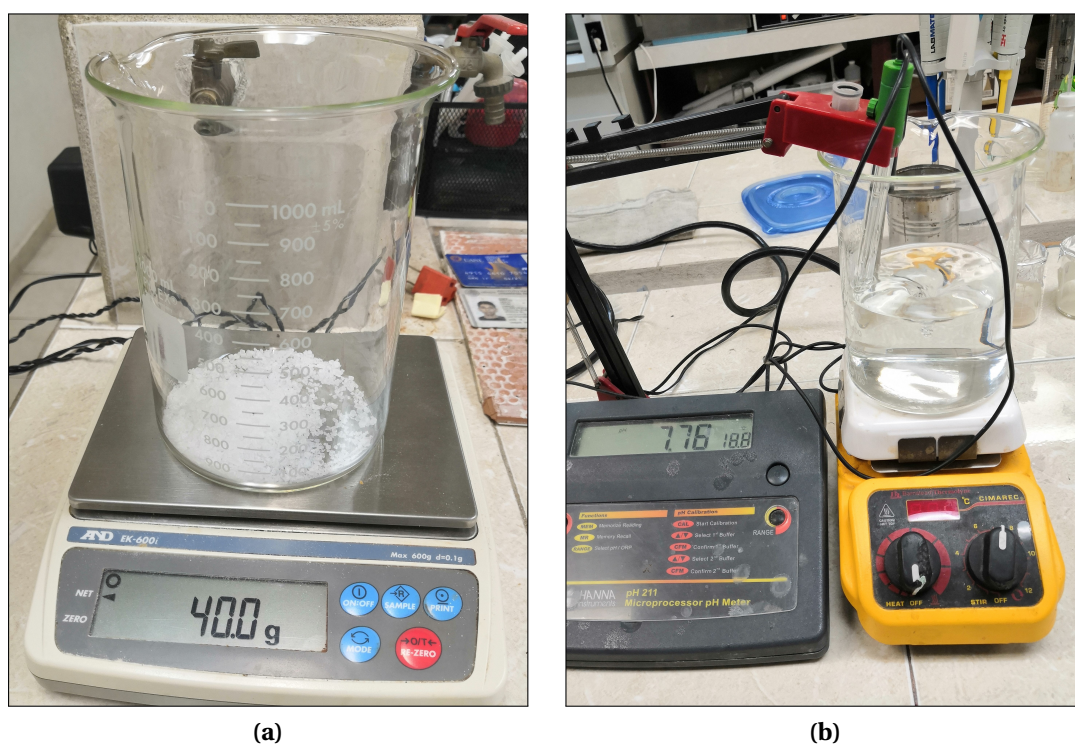


Figura 19. Preparación de agua de mar sintética: (a) pesaje de sal y (b) potenciómetro para ajustar pH.



Figura 20. Cámara de eclosión con quistes de *A. salina*.

más 10 nauplios, se depositan 100 μl de los extractos para tener concentraciones finales de 100, 250, 500, 750 y 1000 $\mu\text{g/ml}$ (ver Figura 21). Como control negativo, agua de mar artificial; como control positivo, KMnO_4 a 400 $\mu\text{g/ml}$. Se incuban a las mismas condiciones por 24 hr.

Se cuentan los nauplios muertos con ayuda de un estereoscopio, como se muestra en la Figura 22, y se determina el porcentaje de muertes para cada dosis. En los casos en los que ocurren muertes en el grupo de control, los datos se corrigen utilizando el criterio de Abbott (Abbott, 1925):

$$\% \text{ de muertes} = \frac{\text{prueba} - \text{control}}{\text{control}} \times 100. \quad (2)$$

Se obtiene la LC_{50} , a partir del porcentaje de muertes a 24 hr utilizando el método de análisis probit (Finney and Tattersfield, 1952).



Figura 21. Microplaca de 96 pozos con nauplios de *A. salina*, extracto y sal de mar.

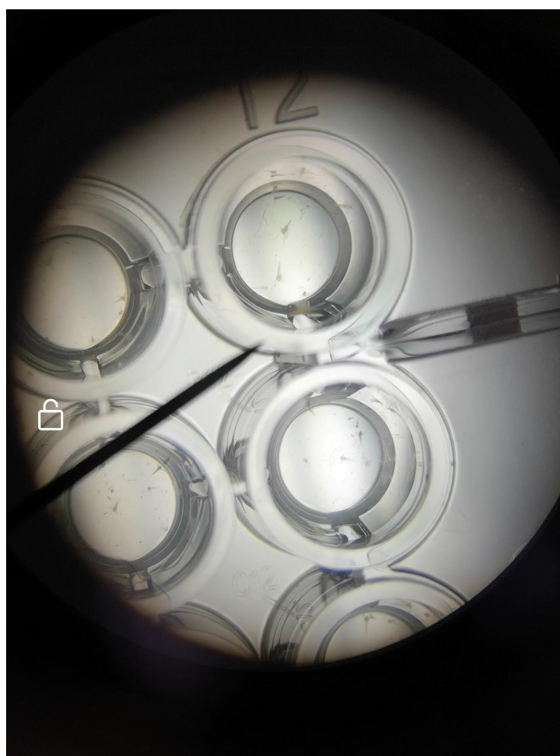


Figura 22. Nauplios de *A. salina* vistos a través de estereoscopio.

El potencial de toxicidad se clasifica, según Meyer, como: (a) no tóxico ($LC_{50} > 1000 \mu\text{g/ml}$); (b) baja toxicidad ($500 < LC_{50} \leq 1000 \mu\text{g/ml}$); (c) moderadamente tóxico ($100 < LC_{50} \leq 500 \mu\text{g/ml}$); y (d) alta toxicidad ($LC_{50} < 100 \mu\text{g/ml}$) (Meyer *et al.*,

1982).

5.7 Análisis de componentes principales

El método de componentes principales es una técnica de análisis de datos que obtiene transformaciones lineales de un grupo de variables correlacionadas, de manera que se logran ciertas condiciones óptimas. La más importante de estas condiciones es que las variables transformadas no están correlacionadas.

El campo del análisis multivariable consiste de aquellas técnicas estadísticas que consideran dos o más variables aleatorias relacionadas como una sola entidad e intentan producir un resultado global teniendo en cuenta la relación entre las variables. Un ejemplo simple de esto es el coeficiente de correlación. La mayoría de las técnicas multivariantes inferenciales son generalizaciones de los procedimientos clásicos univariantes. Correspondiente a la prueba t univariante es la prueba T^2 multivariable y existen análogos multivariantes de técnicas como la regresión y el análisis de varianza.

Sin embargo, existe otra clase de técnicas que es única en el ámbito multivariable. El coeficiente de correlación es un ejemplo de ello. Aunque estas técnicas también pueden emplearse en la inferencia estadística, la mayoría de sus aplicaciones son como técnicas analíticas de datos, en particular, técnicas que buscan describir la estructura multivariable de los datos. El análisis de componentes principales (PCA) es una técnica de este tipo y si bien su uso principal es como técnica descriptiva, también se puede usar en muchos procedimientos inferenciales (Jackson, 1991).

El punto de partida para PCA es la matriz de covarianza de muestra \mathbf{S} (Hotelling,

1933). Para un problema de p variables,

$$\mathbf{S} = \begin{bmatrix} s_1^2 & s_{12} & \cdots & s_{1p} \\ s_{12} & s_2^2 & \cdots & s_{2p} \\ \vdots & \vdots & & \vdots \\ s_{1p} & s_{2p} & \cdots & s_p^2 \end{bmatrix},$$

donde s_i^2 es la varianza de la i -ésima variable, x_i , y s_{ij} es la covarianza entre la i -ésima y j -ésima variables, si las covarianzas no son iguales a cero, esto indica que existe una relación lineal entre estas dos variables. La fuerza de esa relación está representada por el coeficiente de correlación, $r_{ij} = s_{ij}/(s_i s_j)$.

El método de las componentes principales se basa en un resultado clave del álgebra matricial: una matriz simétrica, no singular, de tamaño $p \times p$, como la matriz de covarianza \mathbf{S} , puede reducirse a una matriz diagonal \mathbf{L} al premultiplicarla y posmultiplicarla por una matriz ortonormal particular \mathbf{U} , tal que

$$\mathbf{U}'\mathbf{S}\mathbf{U} = \mathbf{L}. \quad (3)$$

Los elementos diagonales de \mathbf{L} , l_1, l_2, \dots, l_p se denominan raíces características o valores propios de \mathbf{S} . Las columnas de \mathbf{U} , u_1, u_2, \dots, u_p se denominan vectores característicos o vectores propios de \mathbf{S} . Las raíces características pueden obtenerse de la solución de la siguiente ecuación, llamada ecuación característica:

$$|\mathbf{S} - l\mathbf{I}| = 0, \quad (4)$$

donde \mathbf{I} es la matriz identidad. Esta ecuación produce un polinomio de grado p , a partir del cual los valores se obtienen los valores l_1, l_2, \dots, l_p .

Geométricamente, el procedimiento que se acaba de describir no es más que una rotación del eje principal de los ejes de las coordenadas originales, x , sobre sus medias.

Esta transformación del eje principal transformará las p variables correlacionadas x_1, x_2, \dots, x_p en p nuevas variables no correlacionadas z_1, z_2, \dots, z_p . Los ejes de coordenadas de estas nuevas variables se describen mediante los vectores propios \mathbf{u}_i que forman la matriz de cosenos de dirección \mathbf{U} utilizados en la transformación:

$$\mathbf{z} = \mathbf{U}' [\mathbf{x} - \bar{\mathbf{x}}], \quad (5)$$

donde \mathbf{x} y $\bar{\mathbf{x}}$ son vectores, de tamaño $p \times 1$, de observaciones de las variables originales y sus medias.

Las variables transformadas se denominan los componentes principales (PC) de \mathbf{x} . La i -ésima componente principal es

$$z_i = \mathbf{u}_i' [\mathbf{x} - \bar{\mathbf{x}}] \quad (6)$$

y tendrá media cero y varianza l_i , el i -ésimo valor propio. Para distinguir entre las variables transformadas y las observaciones transformadas, las variables transformadas se llamarán componentes principales y las observaciones transformadas individuales se llamarán puntuaciones z .

5.7.1 Escalamiento de los vectores característicos

Los vectores característicos empleados hasta ahora, los vectores \mathbf{U} , son ortonormales; son ortogonales y tienen longitud unitaria. Estos vectores se escalan a la unidad. El uso de estos vectores producirá PC no correlacionadas y con varianzas iguales a los valores propios correspondientes. Hay varias formas alternativas de escalar estos vectores,

una que ha encontrado uso generalizado es

$$\mathbf{w}_i = \frac{\mathbf{u}_i}{\sqrt{l_i}}, \quad (7)$$

esto es

$$\mathbf{W} = \mathbf{U}\mathbf{L}^{-1/2}. \quad (8)$$

De aquí se tiene que

$$\mathbf{W}'\mathbf{W} = \mathbf{L} \quad (9)$$

$$\mathbf{W}'\mathbf{S}\mathbf{W} = \mathbf{I} \quad (10)$$

Las componentes principales obtenidas con la transformación

$$y_i = \mathbf{w}_i' [\mathbf{x} - \hat{\mathbf{x}}] \quad (11)$$

producirán PC que no están correlacionadas, pero ahora tienen varianzas iguales a la unidad. Los valores de esta cantidad se denominan puntuaciones y . Dado que las PC son generalmente consideradas como variables “artificiales”, las puntuaciones que tienen varianzas unitarias son muy populares para el análisis de datos y las aplicaciones de control de calidad.

5.7.2 T^2 como medida de variabilidad

La cantidad

$$T^2 = \mathbf{y}'\mathbf{y} \quad (12)$$

es una cantidad que indica la conformidad general de un vector de observación individual con su media o un estándar establecido. Esta cantidad, debida a Hotelling (1931), es una generalización multivariable de la prueba t de Student.

La forma original de T^2 es

$$T^2 = [\mathbf{x} - \hat{\mathbf{x}}]' \mathbf{S}^{-1} [\mathbf{x} - \hat{\mathbf{x}}], \quad (13)$$

que no usa PCA y es una estadística que se usa a menudo en el control de calidad multivariable. De (10), $\mathbf{S}^{-1} = \mathbf{W}\mathbf{W}'$. Sustituyéndo en (13), y usando (11),

$$\begin{aligned} T^2 &= [\mathbf{x} - \hat{\mathbf{x}}]' \mathbf{W}\mathbf{W}' [\mathbf{x} - \hat{\mathbf{x}}] \\ &= \mathbf{y}'\mathbf{y}, \end{aligned} \quad (14)$$

y por lo tanto (12) y (13) son equivalentes. Lo importante de T^2 es que cumple con las condiciones de un correcto control de calidad multivariable:

1. Debe responder a la pregunta “¿está el proceso controlado?” con una sola respuesta.
2. Debe especificar un error global Tipo I.
3. El procedimiento debe tomar en cuenta las relaciones entre las variables.

La ventaja de (12) sobre (13) es que si se ha obtenido \mathbf{W} , los cálculos son considerablemente más fáciles ya que no hay matriz que invertir. De hecho, $\mathbf{y}'\mathbf{y}$ es simplemente la suma de los cuadrados de las componentes principales escaladas.

6. RESULTADOS

6.1 Obtención de los Extractos Vegetales de Estudio

Se obtuvieron los extractos vegetales. Una vez filtrados y evaporado el solvente, el rendimiento obtenido del extracto de *Rosmarinus officinalis* fue de 72.9 %; el rendimiento del extracto de *Thymus vulgaris* fue de 84.02 %.

6.2 Pruebas Fitoquímicas

Los resultados de las pruebas químicas de los metabolitos secundarios presentes en los extractos etanólicos evaluados se presentan en la Tabla II.

La Figura 23 muestra el control negativo para cada uno de los extractos, diluidos en etanol, que sirvieron de referencia para las pruebas fitoquímicas realizadas.

TABLA II

Resultados de las pruebas fitoquímicas a las plantas de estudio

Compuesto	<i>Thymus vulgaris</i>	<i>Rosmarinus officinalis</i>
Grupo carboxilo	Positivo	Positivo
Grupo carbonilo	Positivo	Positivo
Oxhidrilos fenólicos (taninos)	Positivo	Positivo
Esteroles	Negativo	Negativo
Triterpenos	Positivo	Negativo
Carbohidratos	Positivo	Negativo
Sesquiterpenlactonas	Positivo	Positivo
Alcaloides	Positivo	Negativo
Flavonoides	Positivo	Negativo

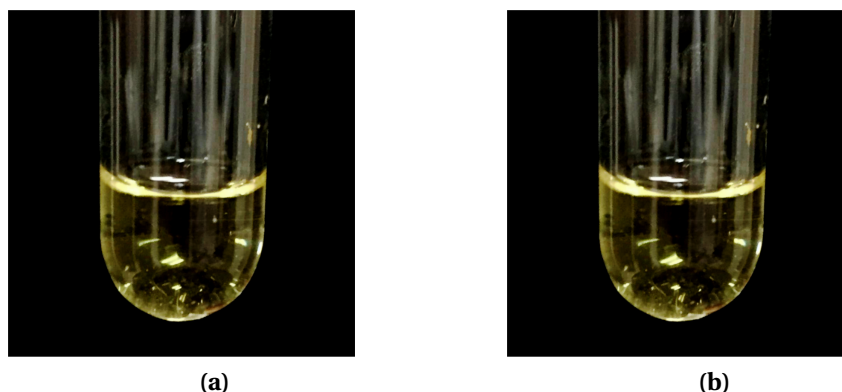


Figura 23. Controles negativos para pruebas fitoquímicas: (a) *Rosmarinus officinalis* y (b) *Thymus vulgaris*.

Las pruebas fitoquímicas reportaron que el *Rosmarinus officinalis* mostró, dentro de su componentes, al grupo carboxilo (ver Figura 24(b)), grupo carbonilo (ver Figura 25(b)), oxhidrilos fenólicos (taninos) (ver Figura 26(b)) y sesquiterpenlactonas (ver Figura 27(b)).

Por otro lado, *Thymus vulgaris* dio positivo a las pruebas del grupo carboxilo (ver Figura 24(c)), grupo carbonilo (ver Figura 25(c)), oxhidrilos fenólicos (taninos) (ver Figura 26(c)), sesquiterpenlactonas (ver Figura 27(c)), triterpenos (ver Figura 28(c)), flavonoides (ver Figura 29(c)), carbohidratos (ver Figura 30(c)) y alcaloides (ver Figura 31(c)). Ambas especies dieron negativo a esteroides (ver Figura 28).

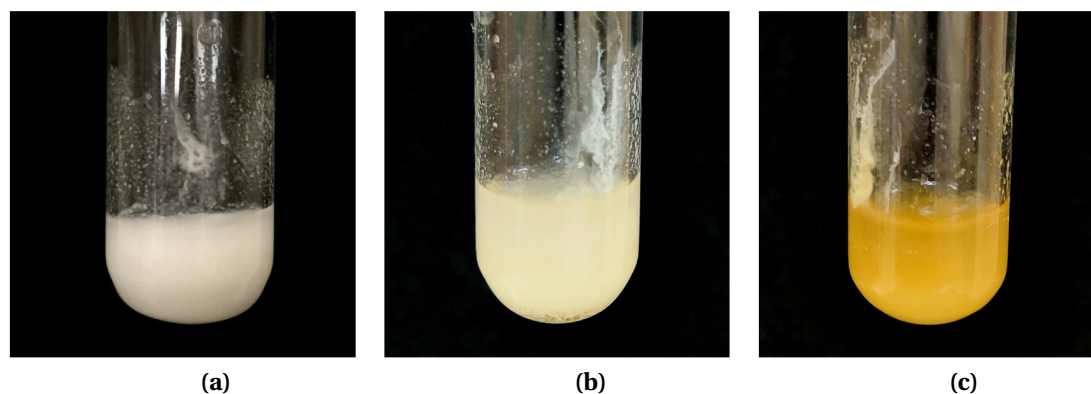


Figura 24. Prueba fitoquímica para grupo carboxilo: (a) control positivo, (b) *Rosmarinus officinalis* y (c) *Thymus vulgaris*.

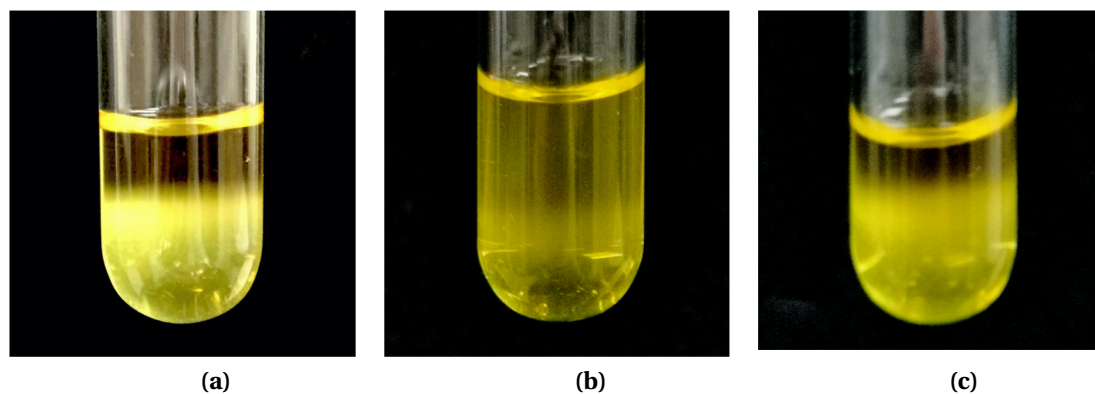


Figura 25. Prueba fitoquímica para grupo carbonilo: (a) control positivo, (b) *Rosmarinus officinalis* y (c) *Thymus vulgaris*.

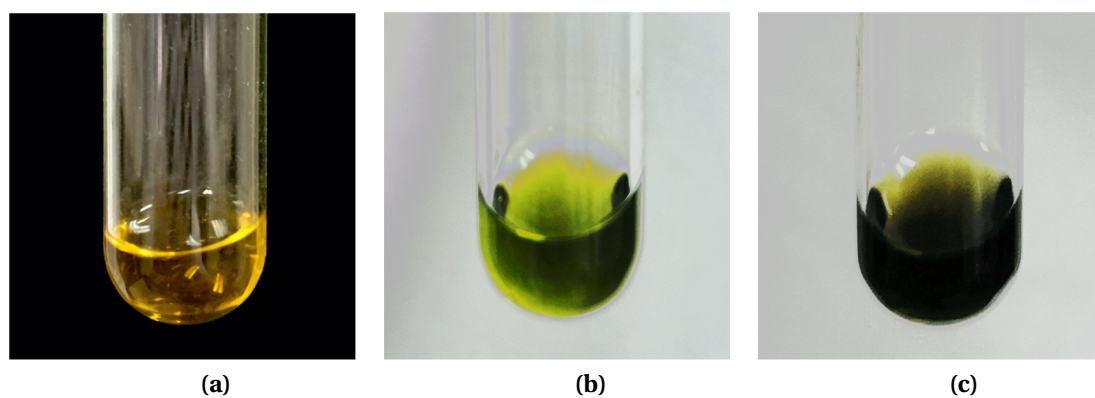


Figura 26. Prueba fitoquímica para taninos: (a) control positivo, (b) *Rosmarinus officinalis* y (c) *Thymus vulgaris*.

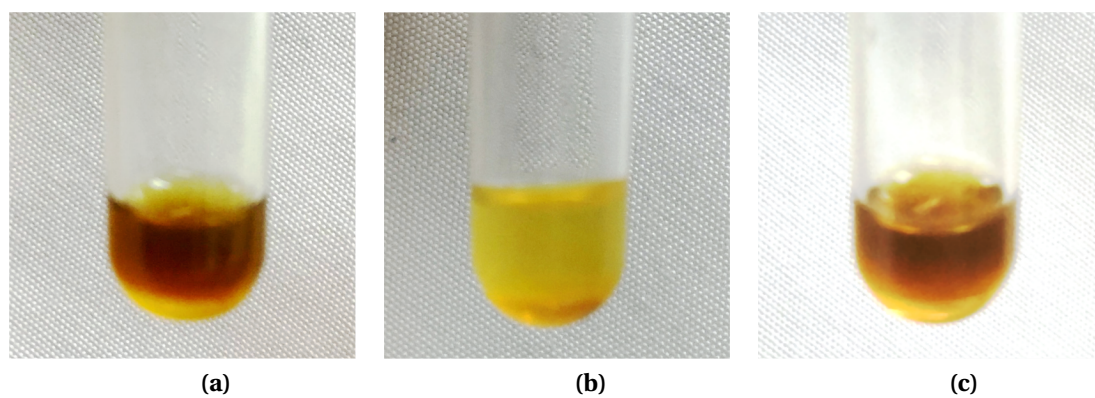


Figura 27. Prueba fitoquímica para sesquiterpenlactonas: (a) control positivo, (b) *Rosmarinus officinalis* y (c) *Thymus vulgaris*.

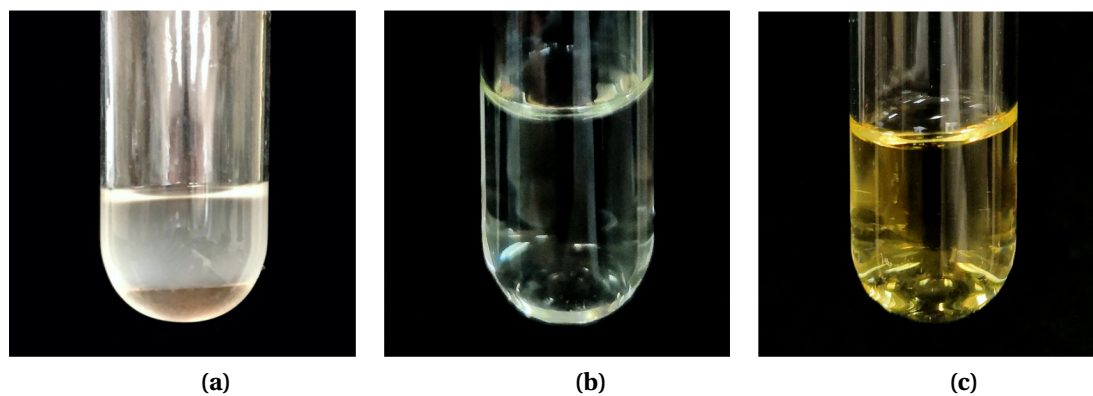


Figura 28. Prueba fitoquímica para triterpenos y esteroides: (a) control positivo, (b) *Rosmarinus officinalis* y (c) *Thymus vulgaris*.

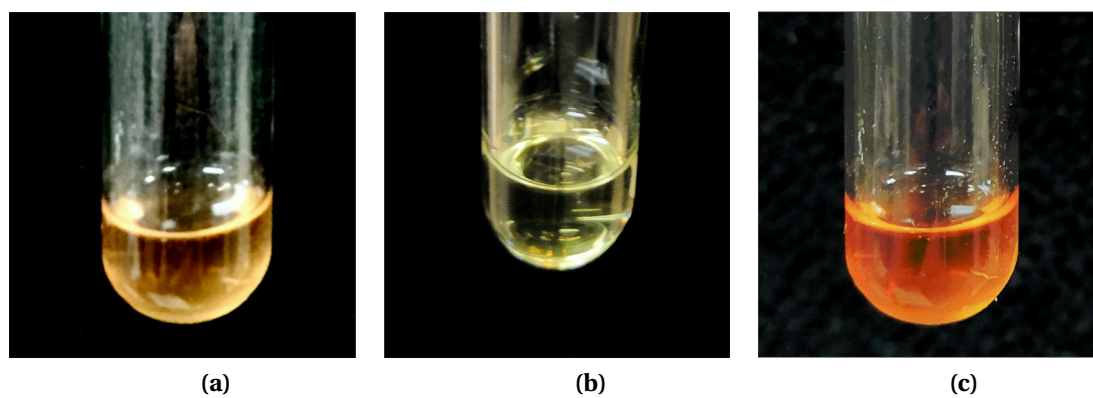


Figura 29. Prueba fitoquímica para flavonoides: (a) control positivo, (b) *Rosmarinus officinalis* y (c) *Thymus vulgaris*.

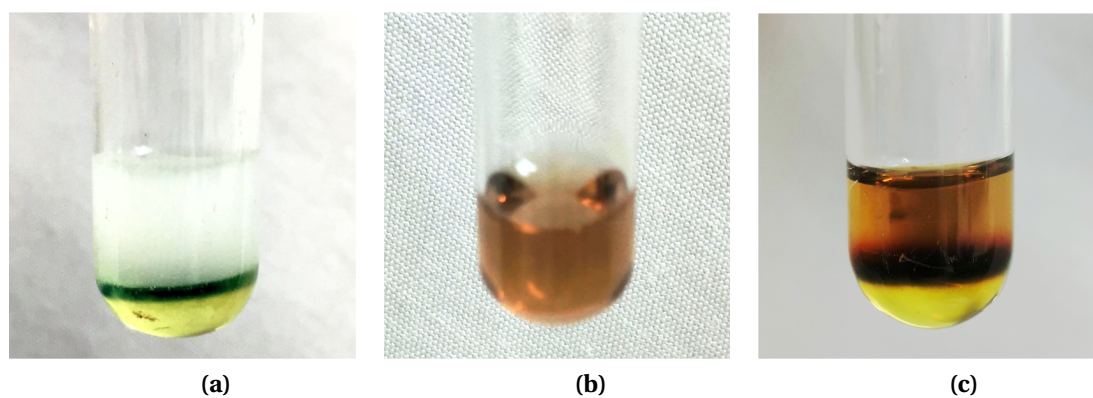


Figura 30. Prueba fitoquímica para carbohidratos: (a) control positivo, (b) *Rosmarinus officinalis* y (c) *Thymus vulgaris*.

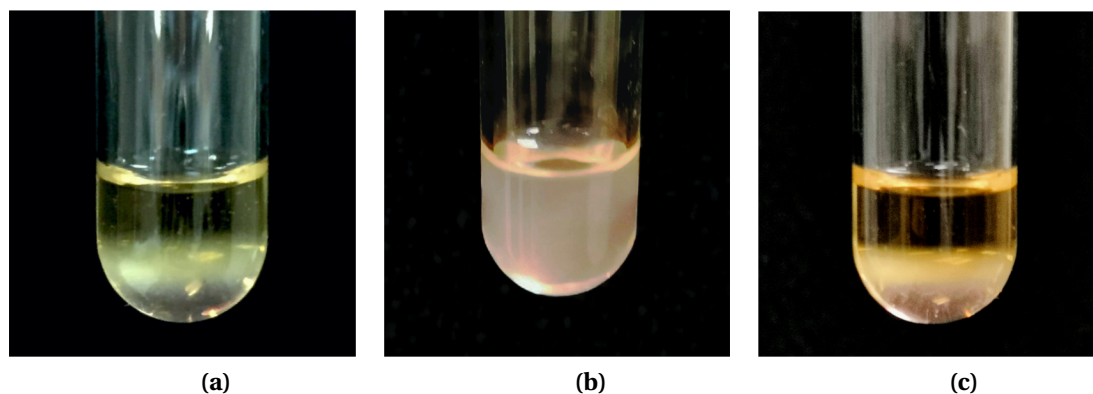


Figura 31. Prueba fitoquímica para alcaloides: (a) control positivo, (b) *Rosmarinus officinalis* y (c) *Thymus vulgaris*.

6.3 Actividad Antibacteriana

La Figura 32 presenta la actividad antibacteriana sobre las cepas de *S. mutans* y *S. sobrinus*, de los extractos de *Rosmarinus officinalis* (Figura 32(a)) y *Thymus vulgaris* (Figura 32(b)). Contra *S. sobrinus*, el *Rosmarinus officinalis* presenta halos de inhibición mayores que los halos del *Thymus vulgaris*. Contra *S. mutans*, el *Thymus vulgaris* presenta halos de inhibición similares a los halos del *Rosmarinus officinalis*.

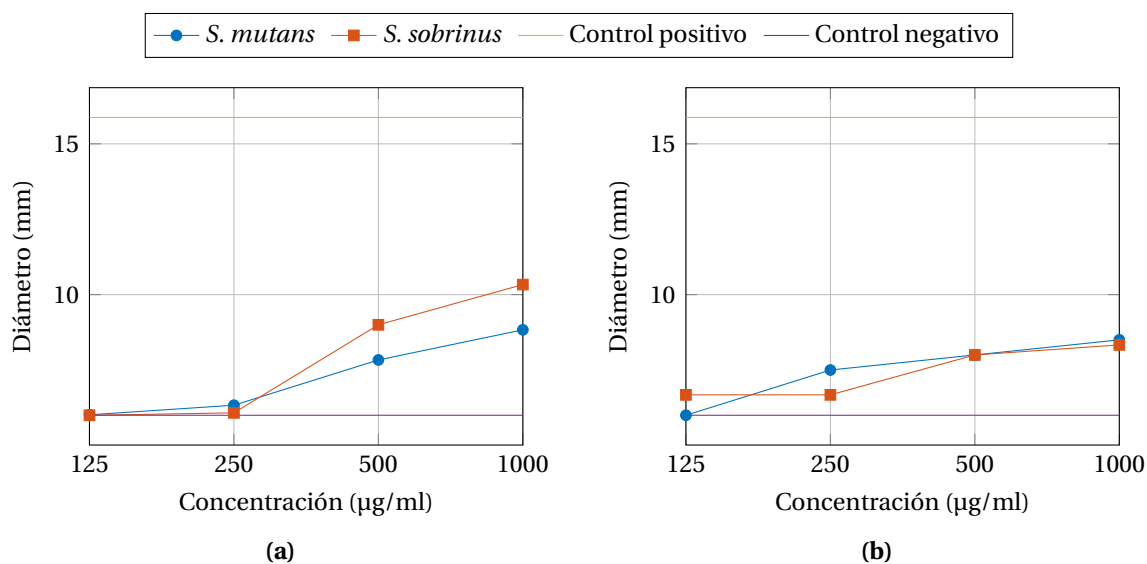


Figura 32. Actividad inhibitoria de (a) *Rosmarinus officinalis* y (b) *Thymus vulgaris*.

La Figura 33 muestra las puntuaciones obtenidas al transformar las mediciones de los diámetros de los halos de inhibición de los extractos en los ejes definidos por las componentes principales.

Para todos los casos, la primera componente principal (PC) representa, esencialmente, la relación entre el diámetro del halo y la concentración; e implica que al incrementarse las concentraciones, se incrementarán los diámetros de los halos de inhibición. También, en todos los casos, dos componentes principales explican el 100 % de la variabilidad de los datos, como se muestra en la Tabla III.

Para el *Rosmarinus officinalis*, evaluado contra *S. mutans*, la segunda componente principal, que representa el 28.912 % de la variabilidad total, tiene coeficientes que indican un contraste entre la primera y tercera concentraciones, respecto a la segunda y cuarta concentraciones. Con respecto a la acción contra el *S. sobrinus*, la segunda componente principal, que representa el 1.4146 % de la variabilidad total, muestra un contraste entre la primera y segunda concentraciones.

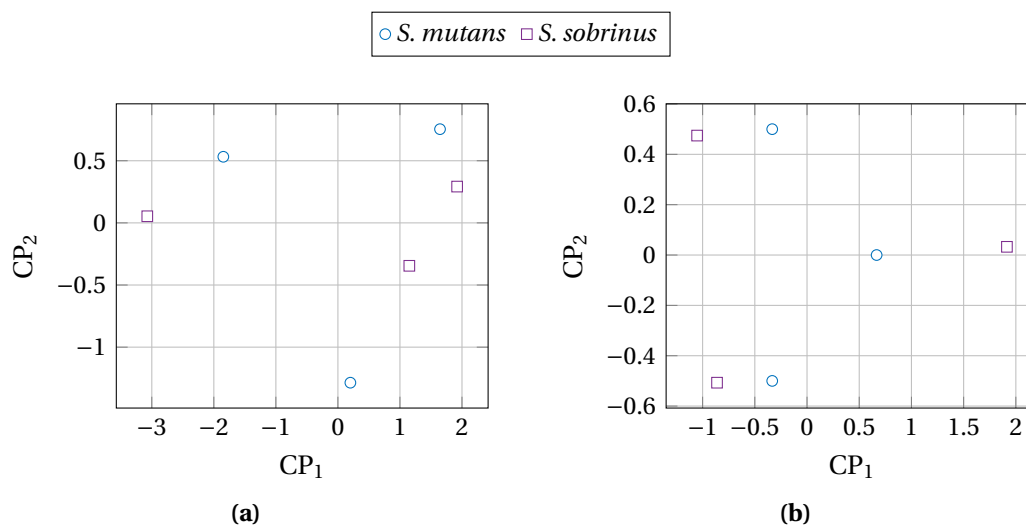


Figura 33. Puntuaciones de las observaciones de la actividad antimicrobiana (halos de inhibición) de los extractos contra *S. mutans* y *S. sobrinus*: (a) *Rosmarinus officinalis* y (b) *Thymus vulgaris*.

TABLA III

Valores propios de las matrices de covarianzas de la actividad antimicrobiana (halos de inhibición) de los extractos contra *S. mutans* y *S. sobrinus*

Cepa bacteriana	Valor propio λ_1	Valor propio λ_2
<i>Rosmarinus officinalis</i>		
<i>S. mutans</i>	3.0805	1.2528
<i>S. sobrinus</i>	7.2296	0.1037
<i>Thymus vulgaris</i>		
<i>S. mutans</i>	0.3333	0.250
<i>S. sobrinus</i>	2.7588	0.240

Para el *Thymus vulgaris*, evaluado contra *S. mutans*, la segunda componente indica un contraste de la segunda concentración contra el resto de las concentraciones, y representa un 42.857 % de la variabilidad de los datos.

Con respecto a la acción contra el *S. sobrinus*, la segunda componente principal indica un contraste marcado entre la tercera concentración contra la primera y segunda concentraciones, representando el 8.0565 % de la variabilidad de los datos.

Los valores de T^2 para todas las observaciones se mantuvieron constantes, $T^2 = 1.33$, lo que indica que ninguna observación estuvo fuera de control.

6.4 Concentración Mínima Inhibitoria

La concentración mínima inhibitoria (MIC) permite identificar la dosis mínima con la que se presenta inhibición en las sustancias de estudio. Para este análisis se consideró como blanco o testigo, medio de cultivo con bacteria de estudio; control negativo, etanol al 10 %, y control positivo clorhexidina al 0.12 %. Las dosis de análisis fueron, para *Rosmarinus officinalis*: dosis 1, 100 µg/ml; dosis 2, 150 µg/ml; dosis 3, 200µg/ml; dosis 4, 250 µg/ml; y dosis 5, 300 µg/ml. En el extracto de *Thymus vulgaris* las dosis de estudio

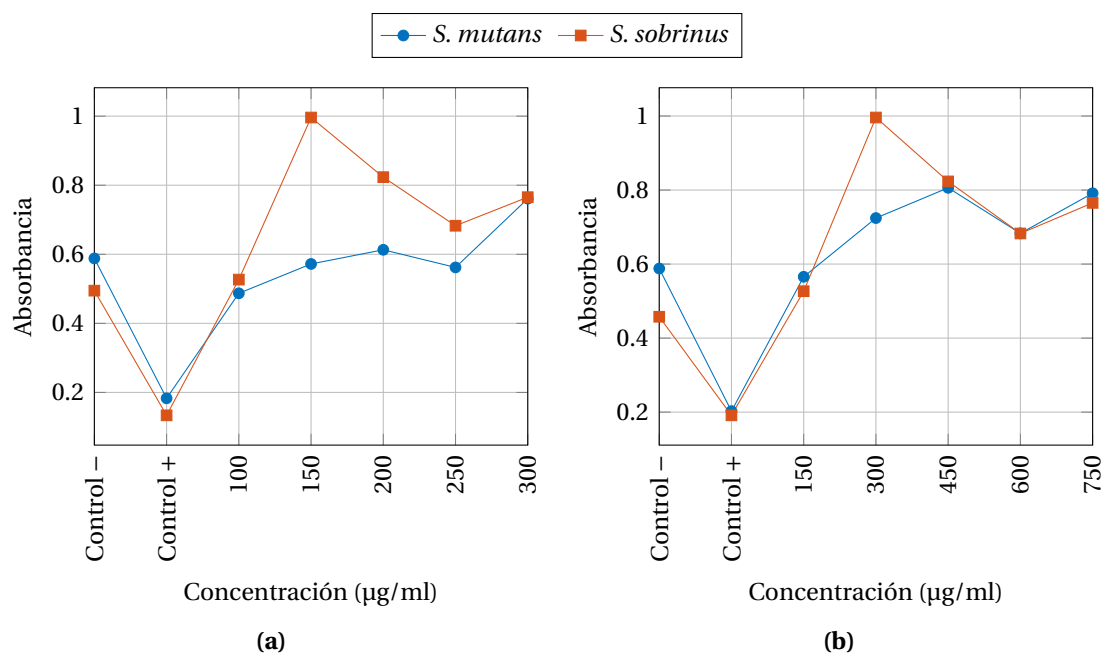


Figura 34. Absorbancia de los extractos a 655 nm: (a) *Rosmarinus officinalis* y (b) *Thymus vulgaris*.

fueron: dosis 1, 150 µg/ml; dosis 2, 300 µg/ml; dosis 3, 450 µg/ml; dosis 4, 600 µg/ml; y dosis 5, 750 µg/ml.

La Figura 34(a) muestra la revisión del extracto de *Rosmarinus officinalis*. Contra la bacteria *S. mutans*, la MIC fue de 100 µg/ml. Por otro lado, frente a la bacteria *S. sobrinus*, la MIC fue, igualmente, la primera dosis, 100 µg/ml. La Figura 34(b) muestra la evaluación del extracto de *Thymus vulgaris*. Frente a la bacteria *S. mutans*, la MIC fue de 150 µg/ml; mientras que frente a la bacteria *S. sobrinus*, la MIC fue de 150 µg/ml.

6.5 Pruebas de Toxicidad

Los resultados de la prueba de letalidad contra *Artemia salina* de los extractos se muestran en la Tabla IV. De acuerdo a Meyer *et al.* (1982), ambos extractos son moderadamente tóxicos con valores de LC_{50} de 230.43 y 455.56 µg/ml, para *Rosmarinus officinalis* y *Thymus vulgaris*, respectivamente.

TABLA IV

Valores promedio de LC_{50} para los extractos de *Rosmarinus officinalis* y *Thymus vulgaris*

Especie	LC_{50} ($\mu\text{g/ml}$)	Intervalo de confianza 95 %
<i>Rosmarinus officinalis</i>	230.43	(156.33–304.53)
<i>Thymus vulgaris</i>	455.56	(394.49–516.63)

Los valores de LC_{50} de los extractos, mostrados en la Tabla IV, se obtuvieron a partir de la regresión probit de las pruebas de letalidad, mostradas en la Figura 35.

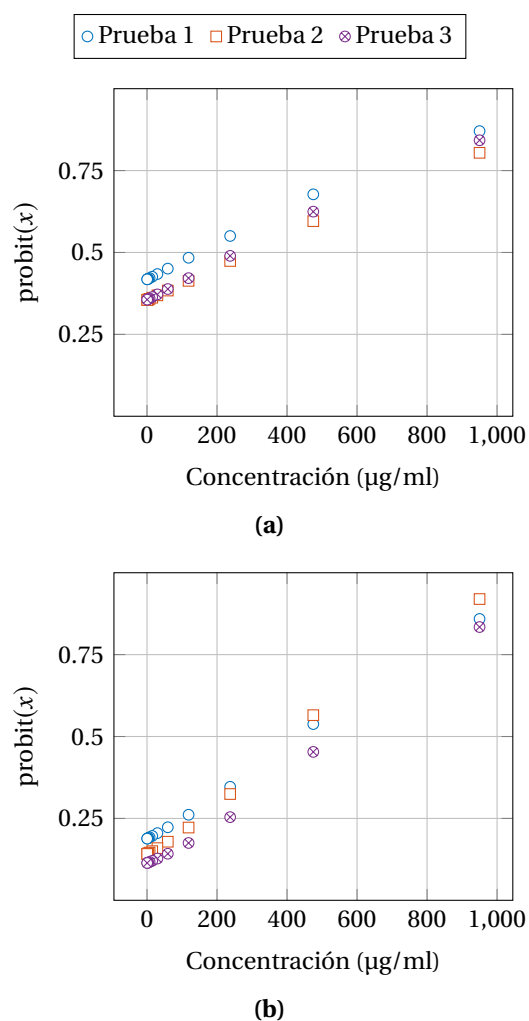


Figura 35. Regresión probit de la letalidad contra *Artemia salina* de los extractos: (a) *Rosmarinus officinalis* y (b) *Thymus vulgaris*.

7. DISCUSIÓN

El estudio de las plantas con fines terapéuticos en odontología se ha incrementado en la actualidad, en su mayoría destinados a controlar o eliminar los principales agentes causales de la caries dental como son el *S. mutans* y el *S. sobrinus* (Benn *et al.*, 2018).

En un estudio realizado en Ecuador, se evaluó la acción antimicrobiana de *S. mutans* a través de la técnica de difusión en placa por discos. Se utilizó extracto acuoso de *Rosmarinus officinalis* al 1.5 y 3 % que no mostró efecto antibacteriano sobre el *S. mutans* y extracto oleoso al 50 % que presentó una media de 11.3 mm de halo de inhibición (Solano *et al.*, 2016). En contraste, en esta tesis se utilizó un extracto etanólico de *Rosmarinus officinalis*, presentando acción antibacteriana con una media de 7.95 mm en el halo de inhibición, para *S. mutans*.

Otro estudio, realizado por de Oliveira *et al.* (2017), expuso el efecto antimicrobiano del *Rosmarinus officinalis* sobre biopelículas monomicrobianas de *S. mutans*. Se expuso la bacteria a 0.2 µl de dicho extracto, durante 5 min (con diluciones en serie (1 : 2), con dilución inicial de 2000 µg/ml, hasta la décima dilución). En este estudio, la exposición fue durante más tiempo (48 hr), a concentraciones de 1000, 500, 250 y 125 µg/ml.

En el estudio hecho por Sakkas y Papadopoulou (2017), se observó que el extracto oleoso de *Thymus vulgaris* presenta efecto bacteriostático contra cinco microorganismos gram positivos, entre ellos el *Staphylococcus epidermidis* y *Escherichia coli*. En forma similar, en nuestro estudio se está probando su efecto antimicrobiano contra *S. mutans*, que es una bacteria grampositiva.

Mahmoodi *et al.* (2019) elaboraron el extracto de *Thymus vulgaris*, pulverizando

la planta por medio de un mortero y pistilo, y usaron 200 ml de etanol al 70 % con 100 g de polvo. Obtuvieron halos de inhibición que van desde 10.5 a 12.7 mm. En el presente estudio, las plantas no se pulverizaron, únicamente se separaron las hojas de los tallos y se pusieron a macerar 64.27 mg de *T. vulgaris* con 1000 ml de etanol al 96 % para obtener una media de 7.33 mm en el halo de inhibición contra el *S. mutans*.

En el estudio de Hardi *et al.* (2019), también utilizan la técnica de maceración con etanol al 95 % como en esta tesis. En otros estudios se utilizan otras técnicas de extracción. Como en el trabajo de Lopes *et al.* (2019), que utilizan como técnica la infusión; o en el estudio de Konda *et al.* (2019), que utilizan el extractor Soxhlet.

Se ha observado un aumento en la resistencia a los antibióticos, por lo que el uso de agentes antimicrobianos derivados de plantas podría servir como un tratamiento alternativo contra las infecciones en cavidad oral. En el estudio realizado por Hickl *et al.* (2018), se evalúa el efecto antimicrobiano de cinco extractos, incluido el *Rosmarinus officinalis* y el *Thymus* del tipo *longicaulis* contra ocho patógenos orales, incluido el *S. mutans*. Se demostró que tuvieron actividad entre moderada y alta contra los microorganismos de la cavidad oral, al igual que en el presente estudio. Teniendo, de igual manera, clorhexidina como control positivo.

La concentración mínima inhibitoria para ambos extractos de estudio, frente a las bacterias de referencia, fue la dosis 1; que corresponde a 100 µg/ml para *Rosmarinus officinalis* y 150 µg/ml para *Thymus vulgaris*. Sin embargo, no fueron menores que los datos de absorbancia presentados por el control positivo.

En el presente trabajo, se utilizaron pruebas fitoquímicas para determinar los compuestos secundarios que forman parte de los extractos de estudio. En el estudio realizado por Wittayapipath *et al.* (2019) utilizan la microspectroscopia.

Los extractos presentados en este estudio mostraron respuesta positiva a taninos,

saponinas, flavonas, flavonoles y xantonas, al igual que en el estudio realizado por Rocha-Filho *et al.* (2015), donde se realizaron pruebas con *Artemia salina* de un compuesto que dio positivo a las mismas pruebas fitoquímicas. Se observó que el extracto presentado en ese estudio mostró toxicidad.

En las pruebas de letalidad realizadas en esta tesis, observamos que el *Rosmarinus officinalis* mostró ser un extracto moderadamente tóxico, debido a los fenoles. Sin embargo, en el estudio realizado por Amar *et al.* (2017) se demostró que los compuestos fenólicos tienen efecto antiproliferativo contra células cancerígenas.

En el estudio realizado por Martins *et al.* (2015), se estudia el extracto hidroalcohólico de *Thymus vulgaris*. Al igual que en el presente estudio, se observa la presencia de compuestos fenólicos, lo que le confiere propiedades antioxidantes y antibacterianas.

En este estudio, se decidió usar la prueba de letalidad con nauplios de *Artemia salina*, al igual que en diversos estudios, como los realizados por Ogbole *et al.* (2017); Monteiro *et al.* (2018); Olivares-Bañuelos *et al.* (2019); Silva *et al.* (2018); Taviano *et al.* (2018), que trabajan con extractos de diferentes plantas. En otros estudios, se llevan a cabo pruebas de letalidad en diferentes especies; como los realizados por Abid y Mahmood (2019) y Haji Ibrahim *et al.* (2019), quienes realizan las pruebas de toxicidad en ratas; Jiang *et al.* (2018), en *Daphnia magna*, que es otro crustáceo; y Alafiatayo *et al.* (2019), en *Danio rerio*, mejor conocido como pez cebra.

En el estudio realizado por Bogavac *et al.* (2015), estudian el aceite esencial del *Thymus vulgaris* y el ensayo de letalidad lo realizan con camarones de salmuera. Se reveló que presenta toxicidad total. En el presente estudio, la prueba se realizó con *Artemia salina* y el resultado nos indica que es moderadamente tóxico.

El mismo autor, Bogavac *et al.* (2017), dos años después, evalúa el potencial antimicrobiano del *Rosmarinus officinalis*. Al igual que en el presente trabajo, la prueba la realiza

con nauplios de *Artemia salina*, determinando la toxicidad a 19.4 mg/ml. A diferencia de este trabajo, que reporta toxicidad a 230.43 µg/ml.

En diferentes trabajos se han reportado las propiedades del *Rosmarinus officinalis* y del *Thymus vulgaris* como antimicrobianos ((Hickl *et al.*, 2018)), antifúngicos ((Ksouri *et al.*, 2017)) y antioxidantes ((Zairi *et al.*, 2018)). Al igual que en esta investigación, se observó inhibición ante las cepas de *S. mutans* y de *S. sobrinus* y respuestas positivas a metabolitos secundarios. Lo anterior, les da esas características, por lo que el resultado de moderada toxicidad no elimina sus propiedades bioactivas.

8. CONCLUSIONES

Debido a las pruebas fitoquímicas a las que dieron positivo, se demuestra que el *Rosmarinus officinalis* y el *Thymus vulgaris* tienen bioactividad.

Los extractos de *Rosmarinus officinalis* y *Thymus vulgaris* presentan inhibición para las cepas bacterianas de *Streptococcus mutans* y *Streptococcus sobrinus*.

El extracto de *Rosmarinus officinalis* mostró su mayor actividad contra el *S. sobrinus* a una concentración de 1000 µg/ml, con halo de inhibición de 10.3 mm y un halo promedio de 7.8 mm.

El extracto de *Thymus vulgaris* mostró su mayor actividad contra *S. mutans* a una concentración de 500 µg/ml, con halo de inhibición de 8 mm y un halo promedio de 7.3 mm.

El análisis de componente principal nos indica, para todos los casos, que la primera componente principal, que representa la relación entre el diámetro del halo y la concentración, implica que al incrementarse las concentraciones, se incrementarán los diámetros de los halos de inhibición.

Las concentración mínima de inhibición en ambos extractos, para ambas cepas bacterianas, fue la primera dosis de evaluación: para *Rosmarinus officinalis* fue de 100 µg/ml; y para el *Thymus vulgaris*, 150 µg/ml.

Ambos extractos son moderadamente tóxicos (con LC₅₀ de 230.43 y 455.56 µg/ml para *Rosmarinus officinalis* y *Thymus vulgaris*, respectivamente) por lo que debe evitarse el uso sin restricciones.

8.1 Recomendaciones y Trabajos Futuros

Se recomienda realizar pruebas adicionales para que los extractos estudiados puedan tener uso terapéutico:

- Evaluar la actividad antibacteriana, *in vitro*, por fracciones.
- Evaluar la toxicidad, *in vitro*, por fracciones.
- Realizar pruebas citotóxicas en células humanas.
- Realizar pruebas de actividad citotóxica, *in vitro*, frente a células tumorales.
- Formular un producto natural en sistemas de liberación micro y nanoparticulados.

LITERATURA CITADA

- AAPD Council on Clinical Affairs (2014). Caries-risk assessment and management for infants, children, and adolescents. *Oral Health Policies & Recommendations (Reference Manual)*, 40(6):205–212.
- Abid, R. y Mahmood, R. (2019). Acute and sub-acute oral toxicity of ethanol extract of cassia fistula fruit in male rats. *Avicenna J Phytomed*, 9(2):117–125.
- Abbott, W. S. (1925). A method of computing the effectiveness of an insecticide. *Journal of Economic Entomology*, 18(2):265–267.
- Alafiatayo, A. A., Lai, K.-S., Syahida, A., Mahmood, M. y Shaharuddin, N. A. (2019). Phytochemical evaluation, embryotoxicity, and teratogenic effects of curcuma longa extract on zebrafish (Danio rerio). *Evidence-Based Complement. Altern. Med.*, 2019:1–10.
- Alonso Noriega, M. J. y Karakowsky, L. (2009). Caries de la infancia temprana. *Perinatología y Reproducción Humana*, 23(2):90–97.
- Alshehri, F. A. (2018). The use of mouthwash containing essential oils (LISTERINE®) to improve oral health: A systematic review. *The Saudi Dental Journal*, 30(1):2–6.
- Amar, Y., Meddah, B., Bonacorsi, I., Costa, G., Pezzino, G., Saija, A., Cristani, M., Boussahel, S., Ferlazzo, G. y Meddah, A. T. (2017). Phytochemicals, antioxidant and antiproliferative properties of Rosmarinus officinalis L on U937 and CaCo-2 cells. *Iran J Pharm Res.*, 16(1):315–327.

- American Academy on Pediatric Dentistry y American Academy of Pediatrics (2009). Policy on early childhood caries (ECC): Classifications, consequences, and preventive strategies. *Pediatric Dentistry Journal*, 30(7):40–43.
- Andrews, J. M. (2001). Determination of minimum inhibitory concentrations. *J. Antimicrob. Chemother.*, 48(suppl_1):5–16.
- Arıcan, E. (2009). Inhibition of crown-gall tumorigenesis with plant extracts. *Pharmaceutical Biology*, 47(5):463–466.
- Barahona, M. y Sánchez-Fortún, S. (1999). Toxicity of carbamates to the brine shrimp *artemia salina* and the effect of atropine, BW284c51, iso-OMPA and 2-PAM on carbaryl toxicity. *Environmental Pollution*, 104(3):469–476.
- Bauer, A. W., Kirby, W. M. M., Sherris, J. C. y Turck, M. (1966). Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. *American Journal of Clinical Pathology*, 45(4_ts):493–496.
- Benn, A., Heng, N., Broadbent, J. y Thomson, W. (2018). Studying the human oral microbiome: Challenges and the evolution of solutions. *Australian Dental Journal*, 63(1):14–24.
- Bogavac, M., Karaman, M., Janjušević, L., Sudji, J., Radovanović, B., Novaković, Z., Simeunović, J. y Božin, B. (2015). Alternative treatment of vaginal infections - in vitro antimicrobial and toxic effects of *Coriandrum sativum* L. and *Thymus vulgaris* L. essential oils. *Journal of Applied Microbiology*, 119(3):697–710.
- Bogavac, M. A., Karaman, M. A., Sudi, J. J., Radovanović, B. B., Janjušević, L. N., Četković, N. B. y Tešanović, K. D. (2017). Antimicrobial potential of *Rosmarinus officinalis* commercial essential oil in the treatment of vaginal infections in pregnant women. *Nat Prod Commun*, 12(1):127–130.

- Braga, A. S., Degand, G. D., Pires, J. G., Soares, D. y Magalhaes, A. C. (2018). Effect of oral antimicrobial mouthrinses containing alcohol on viability of *Streptococcus mutans* and microcosm biofilm and on the prevention of enamel caries lesions. *American Journal of Dentistry*, 31(3):121–125.
- Carballo, J. L., Hernández-Inda, Z. L., Pérez, P. y García-Grávalos, M. D. (2002). A comparison between two brine shrimp assays to detect *in vitro* cytotoxicity in marine natural products. *BMC Biotechnology*, 17(2):1–5.
- Carroll, Pfaller, Landry, McAdam, Patel, Richter y Warnock, editors (2019). *Manual of Clinical Microbiology*. American Society of Microbiology, Sterling, VA, 12a. edición.
- de Oliveira, J. R., de Jesus, D., Figueira, L. W., de Oliveira, F. E., Pacheco Soares, C., Camargo, S. E. A., Jorge, A. O. C. y de Oliveira, L. D. (2017). Biological activities of *Rosmarinus officinalis* L. (rosemary) extract as analyzed in microorganisms and cells. *Experimental Biology and Medicine*, 242(6):625–634.
- Déciga-Campos, M., Rivero-Cruz, I., Arriaga-Alba, M., Castañeda-Corral, G., Angeles-López, G. E., Navarrete, A. y Mata, R. (2007). Acute toxicity and mutagenic activity of Mexican plants used in traditional medicine. *Journal of Ethnopharmacology*, 110(2):334–342.
- Duangthip, D., Chen, K. J., Gao, S. S., Lo, E. C. y Chu, C. H. (2017). Managing early childhood caries with atraumatic restorative treatment and topical silver and fluoride agents. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 14(10):1204.
- Finney, D. J. y Tattersfield, F. (1952). *Probit Analysis: A Statistical Treatment of the Sigmoid Response Curve*. Cambridge University Press, Londres, 2a. edición.
- García, R. A., Villarreal, L. E., Pereyra, B., Rodríguez, O. E., Sánchez, R. I. y Quiroga, M. A. (2012). Actividad bactericida de *rosmarinus officinalis* ante la presencia de

- streptococcus mutans. *Revista Mexicana e Iberoamericana de Investigación Clínica en Odontología*, 2(2):21–30.
- GBD 2015 Disease and Injury Incidence and Prevalence Collaborators (2016). Global, regional, and national incidence, prevalence, and years lived with disability for 310 diseases and injuries, 1990–2015: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2015. *The Lancet*, 388(10053):1545–1602.
- Gunatilaka, A. A. L. y Kingston, D. G. I. (1997). DNA-damaging natural products with potential anticancer activity. In Rahman, A., editor, *Structure and Chemistry (Part F)*, volume 20 of *Studies in Natural Products Chemistry*, pp. 457–505. Elsevier.
- Haji Ibrahim, A. H., Herfindal, L., Rathe, B. yersen, H. L., Almeida, J. R. G. d. S. y Fossen, T. (2019). A novel poly-oxygenated flavone glucoside from aerial parts of the brazilian plant *Neoglaziovia variegata* (Bromeliaceae). *Heliyon*, 5(3):e01369.
- Hallas, D., Fernandez, J. B., Lim, L. J., Catapano, P., Dickson, S. K., Blouin, K. R., Schmidt, T. M., Acal Jimenez, R., Ali, N., Figueroa, K. E., Jiwani, N. M. y Sharma, A. (2015). OHEP: An oral health education program for mothers of newborns. *Journal of Pediatric Health Care*, 29(2):181–190.
- Hardi, E. H., Nugroho, R. A., Kusuma, I. W., Suwinarti, W., Sudaryono, A. y Rostika, R. (2019). Borneo herbal plant extracts as a natural medication for prophylaxis and treatment of *Aeromonas hydrophila* and *Pseudomonas fluorescens* infection in tilapia (*Oreochromis niloticus*). *F1000Research*, 7:1847.
- Hassanshahian, M. y Mohsenipour, Z. (2015). The inhibitory effect of *Thymus vulgaris* extracts on the planktonic form and biofilm structures of six human pathogenic bacteria. *Avicenna J Phytomed*, 5(4):309–318.
- Hickl, J., Argyropoulou, A., Sakavitsi, M. E., Halabalaki, M., Al-Ahmad, A., Hellwig, E.,

- Aligiannis, N., Skaltsounis, A. L., Wittmer, A., Vach, K. y Karygianni, L. (2018). Mediterranean herb extracts inhibit microbial growth of representative oral microorganisms and biofilm formation of *Streptococcus mutans*. *PLoS One*, 13(12):e0207574.
- Hotelling, H. (1931). The Generalization of Student's Ratio. *Ann. Math. Stat.*, 2(3):360–378.
- Hotelling, H. (1933). Analysis of a complex of statistical variables into principal components. *J. Educ. Psychol.*, 24(6):417–441.
- Huebner, C. E. y Riedy, C. A. (2010). Behavioral determinants of brushing young children's teeth: Implications for anticipatory guidance. *Pediatr Dent.*, 32(1):48–55.
- Jackson, J. E. (1991). *A User's Guide to Principal Components*. Wiley Series in Probability and Statistics. John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, NJ, USA.
- Jaki, B., Orjala, J., Bürgi, H.-R. y Sticher, O. (1999). Biological screening of cyanobacteria for antimicrobial and molluscicidal activity, brine shrimp lethality, and cytotoxicity. *Pharmaceutical Biology*, 37(2):138–143.
- Jardak, M., Elloumi-Mseddi, J., Aifa, S. y Mnif, S. (2017). Chemical composition, anti-biofilm activity and potential cytotoxic effect on cancer cells of *Rosmarinus officinalis* L. essential oil from Tunisia. *Lipids in Health and Disease*, 16(1):190.
- Jiang, X., Cao, Y., Jørgensen, L. v. G., Strobel, B. W., Hansen, H. C. B. y Cedergreen, N. (2018). Where does the toxicity come from in saponin extract? *Chemosphere*, 204:243–250.
- Kocak, M. M., Ozcan, S., Kocak, S., Topuz, O. y Erten, H. (2009). Comparison of the efficacy of three different mouthrinse solutions in decreasing the level of *Streptococcus mutans* in saliva. *Eur J Dent.*, 3(1):57–61.
- Konda, P. Y., Dasari, S., Konanki, S. y Nagarajan, P. (2019). *In vivo* antihyperglycemic, an-

- tiyperlipidemic, antioxidative stress and antioxidant potential activities of *Syzygium paniculatum* Gaertn. in streptozotocin-induced diabetic rats. *Heliyon*, 5(3):e01373.
- Kozai, K., Nakayama, R., Tedjosasongko, U., Kuwahara, S., Suzuki, J., Okada, M. y Nagasaka, N. (1999). Intrafamilial distribution of mutans streptococci in japanese families and possibility of father-to-child transmission. *Microbiology and Immunology*, 43(2):99–106.
- Ksouri, S., Djebir, S., Bentorki, A. A., Gouri, A., Hadeif, Y. y Benakhla, A. (2017). Antifungal activity of essential oils extract from *Origanum floribundum* Munby, *Rosmarinus officinalis* L. and *Thymus ciliatus* Desf. against *Candida albicans* isolated from bovine clinical mastitis. *Journal de Mycologie Médicale*, 27(2):245–249.
- Kulkarni, P., Singh, D. K., Jalaluddin, M. y Mandal, A. (2017). Comparative evaluation of antiplaque efficacy between essential oils with alcohol-based and chlorhexidine with nonalcohol-based mouthrinses. *Journal of International Society of Preventive and Community Dentistry*, 7(7):36.
- Lopes, C. M. I., Baratella-Evêncio, L., De Souza, I. A., De Oliveira, E. B., SÁ, J. G. A., Santana, M. A. N., Marcelino Neto, P. P., De Santana, E. S., Da Silva, L. A. y Vieira, J. R. C. (2019). Evaluation of cytotoxicity and wound healing activity of *Avicennia schaueriana* in cream. *An. Acad. Bras. Cienc.*, 91(1).
- Mahmoodi, M., Ayooobi, F., Aghaei, A., Rahmani, M., Taghipour, Z., Hosseini, A., Jafarzadeh, A. y Sankian, M. (2019). Beneficial effects of *Thymus vulgaris* extract in experimental autoimmune encephalomyelitis: Clinical, histological and cytokine alterations. *Biomed. Pharmacother.*, 109:2100–2108.
- Manchanda, K., Sampath, N. y Sarkar, A. D. (2014). Evaluating the effectiveness of oral

- health education program among mothers with 6–18 months children in prevention of early childhood caries. *Contemporary Clinical Dentistry*, 5(4):478.
- Mangla, R. G., Kapur, R., Dhindsa, A. y Madan, M. (2017). Prevalence and associated risk factors of severe early childhood caries in 12- to 36-month-old children of Sirmaur district, Himachal Pradesh, India. *International Journal of Clinical Pediatric Dentistry*, 10(2):183–187.
- Martínez, M., Del Ramo, J., Torreblanca, A. y Díaz-Mayans, J. (1999). Effect of cadmium exposure on zinc levels in the brine shrimp *Artemia parthenogenetica*. *Aquaculture*, 172(3-4):315–325.
- Martins-Júnior, P. A., Vieira-Andrade, R. G., Corrêa-Faria, P., Oliveira-Ferreira, F., Marques, L. S. y Ramos-Jorge, M. L. (2013). Impact of early childhood caries on the oral health-related quality of life of preschool children and their parents. *Caries Research*, 47(3):211–218.
- Martins, N., Barros, L., Santos-Buelga, C., Silva, S., Henriques, M. y Ferreira, I. C. (2015). Decoction, infusion and hydroalcoholic extract of cultivated thyme: Antioxidant and antibacterial activities, and phenolic characterisation. *Food Chemistry*, 167:131–137.
- Meyer, B., Ferrigni, N., Putnam, J., Jacobsen, L., Nichols, D. y McLaughlin, J. (1982). Brine shrimp: a convenient general bioassay for active plant constituents. *Planta Medica*, 45(05):31–34.
- Milgrom, P. M., Huebner, C. E. y Ly, K. A. (2009). Fluoridated toothpaste and the prevention of early childhood caries: A failure to meet the needs of our young. *J Am Dent Assoc.*, 140(6):628–631.
- Monteiro, J. A., Ferreira Júnior, J. M., Oliveira, I. R., Batista, F. L. A., Pinto, C. C. C., Silva, A.

- A. S., Morais, S. M. y Silva, M. G. V. (2018). Bioactivity and toxicity of *Senna cana* and *Senna pendula* extracts. *Biochem. Res. Int.*, 2018:1–10.
- Mosaddad, S. A., Tahmasebi, E., Yazdanian, A., Rezvani, M. B., Seifalian, A., Yazdanian, M. y Tebyanian, H. (2019). Oral microbial biofilms: an update. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, pp. 1–15.
- Ogbole, O. O., Segun, P. A. y Adeniji, A. J. (2017). *In vitro* cytotoxic activity of medicinal plants from Nigeria ethnomedicine on rhabdomyosarcoma cancer cell line and HPLC analysis of active extracts. *BMC Complement. Altern. Med.*, 17(1):494.
- Olivares-Bañuelos, T., Gutiérrez-Rodríguez, A., Méndez-Bellido, R., Tovar-Miranda, R., Arroyo-Helguera, O., Juárez-Portilla, C., Meza-Menchaca, T., Aguilar-Rosas, L., Hernández-Kelly, L., Ortega, A. y Zepeda, R. (2019). Brown seaweed *Egria menziesii*'s cytotoxic activity against brain cancer cell lines. *Molecules*, 24(2):260.
- Maternal and Child Health Bureau Expert Panel. (2007). Topical fluoride recommendations for high-risk children: Development of decision support matrix. Reporte técnico, Altarum Institute, Washington, DC.
- Parisotto, T. M., Steiner-Oliveira, C., Silva, C. M. S. E., Rodrigues, L. K. A. y Nobre-dos Santos, M. (2010). Early childhood caries and mutans streptococci: A systematic review. *Oral Health and Preventive Dentistry*, 8(1):59–70.
- Pelka, M., Danzl, C., Distler, W. y Petschelt, A. (2000). A new screening test for toxicity testing of dental materials. *Journal of Dentistry*, 28(5):341–345.
- Peltzer, K. y Mongkolchat, A. (2015). Severe early childhood caries and social determinants in three-year-old children from Northern Thailand: A birth cohort study. *BMC Oral Health*, 15(1):108.

- Rana, R., Itthagarun, A. y King, N. M. (2007). Effects of dentifrices on artificial caries like lesions: An *in vitro* pH cycling study. *International Dental Journal*, 57(4):243–248.
- Riley, P., Moore, D., Ahmed, E., Sharif, M. O. y Worthington, H. V. (2015). Xylitol-containing products for preventing dental caries in children and adults. *Cochrane Database of Systematic Reviews*.
- Rocha-Filho, C. A., Albuquerque, L. P., Silva, L. R., Silva, P. C., Coelho, L. C., Navarro, D. M., Albuquerque, M. C., Melo, A. M. M., Napoleão, T. H., Pontual, E. V. y Paiva, P. M. (2015). Assessment of toxicity of *Moringa oleifera* flower extract to *Biomphalaria glabrata*, *Schistosoma mansoni* and *Artemia salina*. *Chemosphere*, 132:188–192.
- Sakkas, H. y Papadopoulou, C. (2017). Antimicrobial activity of basil, oregano, and thyme essential oils. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 27(3):429–438.
- Sasidharan, S., Chen, Y., Saravanan, D., Sundram, K. M. y Yoga Latha, L. (2010). Extraction, isolation and characterization of bioactive compounds from plants' extracts. *Afr J Tradit Complement Altern Med.*, 8(1):1–10.
- Schroeder, F. C. y Gronquist, M. (2006). Extending the scope of NMR spectroscopy with microcoil probes. *Angewandte Chemie International Edition*, 45(43):7122–7131.
- Silva, F. R. G., Matias, T. M. S., Souza, L. I. O., Matos-Rocha, T. J., Fonseca, S. A., Mousinho, K. C. y Santos, A. F. (2018). Phytochemical screening and *in vitro* antibacterial, antifungal, antioxidant and antitumor activities of the red propolis alagoas. *Brazilian J. Biol.*
- Sistema de Vigilancia Epidemiológica de Patologías Bucles (2017). Resultados del sistema de vigilancia epidemiológica de patologías bucales. Informe anual, Secretaría de Salud, Ciudad de México.

- Solano, X. K., Moya, T. J. y Zambrano, M. I. (2016). Inhibición del *Streptococcus mutans*, mediante el uso de extracto acuoso y oleoso de *Rosmarinus officinalis* “romero”. *Odontología*, 19(2):29–34.
- Solis, P., Wright, C., Anderson, M., Gupta, M. y Phillipson, J. (1993). A microwell cytotoxicity assay using *Artemia salina* (brine shrimp). *Planta Medica*, 59(03):250–252.
- Szabo, M., Svensson Akusjärvi, S., Saxena, A., Liu, J., Chandrasekar Janebjer, G. y Kitambi, S. S. (2017). Cell and small animal models for phenotypic drug discovery. *Drug Design, Development and Therapy*, 11:1957–1967.
- Taviano, M. F., Rashed, K., Filocamo, A., Cacciola, F., Dugo, P., Mondello, L., Bisignano, C., Acquaviva, R., D'Arrigo, M. y Miceli, N. (2018). Phenolic profile and biological properties of the leaves of *Ficus vasta* Forssk. (moraceae) growing in Egypt. *BMC Complement. Altern. Med.*, 18(1):161.
- Verde-Star, M. J., García-González, S. y Rivas-Morales, C. (2016). Metodología científica para el estudio de plantas medicinales. In Rivas-Morales, C., Oranday-Cárdenas, M. A. y Verde-Star, M. J., editores, *Investigación en plantas de importancia médica*, capítulo 1, pp. 1–40. OmniaScience, Barcelona.
- Vozza, I., Capasso, F., Marrese, E., Polimeni, A. y Ottolenghi, L. (2017). Infant and child oral health risk status correlated to behavioral habits of parents or caregivers: A survey in central Italy. *Journal of International Society of Preventive and Community Dentistry*, 7(2):95.
- Walsh, T., Oliveira-Neto, J. M. y Moore, D. (2015). Chlorhexidine treatment for the prevention of dental caries in children and adolescents. *Cochrane Database of Systematic Reviews*.
- Wijesekera, R., editor (2017). *The Medicinal Plant Industry*. CRC Press, Boca Raton, FL.

- Wittayapipath, K., Laolit, S., Yenjai, C., Chio-Srichan, S., Pakarasang, M., Tavichakorntrakool, R. y Prariyachatigul, C. (2019). Analysis of xanthyletin and secondary metabolites from *Pseudomonas stutzeri* ST1302 and *Klebsiella pneumoniae* ST2501 against *Pythium insidiosum*. *BMC Microbiol.*, 19(1):78.
- World Health Organization (2017). Sugars and dental caries. Nota de información técnica WHO/NMH/NHD/17.12, World Health Organization.
- Yin, X. J., Liu, D. X., Wang, H. C. y Zhou, Y. (1991). A study on the mutagenicity of 102 raw pharmaceuticals used in Chinese traditional medicine. *Mutation Research/Genetic Toxicology*, 260(1):73–82.
- Zairi, A., Nour, S., M'hamdi, N., Bennani, M., Bergaoui, I., Mtiraoui, A., Chaouachi, M. y Trabelsi, M. (2018). Antioxidant, antimicrobial and the phenolic content of infusion, decoction and methanolic extracts of thyme and rosmarinus species. *Current Pharmaceutical Biotechnology*, 19(7):590–599.
- Zheng, C. Y. y Wang, Z. H. (2011). Effects of chlorhexidine, Listerine and fluoride Listerine mouthrinses on four putative root-caries pathogens in the biofilm. *Chinese Journal of Dental Research*, 14(2):135–140.

RESUMEN AUTOBIOGRÁFICO

C. D. Yuvisela Perales Martínez

Candidata para el grado de Maestría en Ciencias Odontológicas en el Área de
Odontopediatría

Tesis: *EVALUACIÓN INVITRO DE ANTISÉPTICOS DE ORIGEN NATURAL CONTRA STREPTOCOCCUS MUTANS Y STREPTOCOCCUS SOBRINUS*

Biografía: Nacida en Saltillo, Coahuila, México, el 16 de diciembre de 1987, hija de José Javier Perales Herrera y María Josefina Martínez Acosta.

Educación: Asistió a Facultad de Odontología de la Universidad Autónoma de Coahuila, Saltillo, Coahuila, donde recibió el grado de Cirujano Dentista, con mención honorífica, en 2011.

Experiencia Profesional: De 2011 a 2016 se desempeñó en consulta privada, como dentista general. En 2019 fue parte de la brigada de atención odontopediátrica en la clínica de la Fundación Esquipulas, San Cristobal de las Casas, Chiapas. Ese mismo año, participó como ponente en el Seminario Clínico de Paciente con Compromiso Sistémico, como parte del 4.º Congreso Internacional de Investigación en Ciencias de la Salud organizado por la Universidad Juárez Autónoma de Tabasco.